

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN PERSONAL EXPUESTO Y NO EXPUESTO A
RADIACIONES IONIZANTES EN CLÍNICAS VETERINARIAS DE SAN JOSÉ EN LOS
AÑOS 2017, 2018 Y 2019.**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Biomédicas para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias
Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular.

SUSTENTANTE:
ANDRÉS CHAVES CAMPOS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A lo largo de los años permanecen lazos que trascienden el tiempo, ahora más fuertes que nunca. Lazos de amor, de alegría y de afecto. Esos lazos los ha unido mi esposa Rebeca, quien ha estado a mi lado durante los momentos más difíciles y arduos de este proceso de maestría. Viviendo nuestra vida juntos, creciendo juntos, fortaleciéndonos juntos, perseverando juntos.

“Tú”, la palabra sola
por donde un gran amor puede pasar
a las islas felices,
seguro, con séquito
de caballos alegres y corales.
-Pedro Salinas

A mi madre Judith, una mujer fuerte, alegre, perseverante. Quien, con mucho esfuerzo, amor y ternura, siempre me impulsó a seguir adelante. Ella construyó los cimientos de todo lo que soy, ella me inculcó la bondad, el respeto, el desprendimiento. Nunca seré capaz de devolver ni agradecer todo lo que ha hecho por mí.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la guía y el trabajo de la Dra. Vanessa Ramirez y de la Licda. Luisa Valle. Investigadoras incansables, talentosas, y más importante aún, llenas de una gran calidez humana, pacientes y comprensivas. Quedo eternamente agradecidas con ellas.

Siempre agradeceré a la MSc. Patricia Mora y a la MSc. Melissa Abarca por todo el conocimiento que aportaron durante la escritura del presente trabajo.

Quisiera reconocer el trabajo de la Dra. Isabel Castro Volio, Q.E.P.D., pionera en nuestro país en el área de la citogenética, sin los cimientos que ella fundó durante décadas de ardua labor, la presente investigación no existiría.

No podría olvidar el trabajo de la Bach. Alejandra Vargas, pues su labor en el análisis de muestras fue fundamental para la presente investigación.

Por último, quisiera dar un profundo agradecimiento para todo el personal del INISA, pues su quehacer científico fue clave en la realización de la presente investigación.

"Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular



M.Sc. Jorge Granados Zúñiga
Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado



Dra. Vanessa Ramírez Mayorga, Ph.D.
Directora de Tesis



M.Sc. Patricia Mora Rodríguez
Asesora



M.Sc. Melissa Abarca Ramírez
Asesora



Dra. Cecilia Díaz Oreiro
Directora del Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas



Lic. Andrés Chaves Campos
Sustentante

Contenido

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos	III
Hoja de aprobación (firmas).....	IV
Resumen	VII
Lista de cuadros	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de gráficos.....	IX
Lista de abreviaturas.....	IX
Hoja de licencia	XI
1. Introducción.....	1
2. Situación actual del conocimiento.....	3
2.1. Rayos X	3
2.2. Física básica de los rayos X.	4
2.3. Riesgo radiobiológico	7
2.4. Fundamentos de radiobiología celular y molecular.....	10
2.4.1. Respuesta al daño radioinducido del ADN.....	12
2.5. Ensayo de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad de las radiaciones ionizantes.....	17
2.6. Causas de la inducción de micronúcleos por radiaciones ionizantes.	21
2.6.1. Rupturas de la molécula de ADN.	22
2.6.2. Cromotripsis.	25
3. Justificación.....	26
3.1. Objetivo General.....	33
3.2. Objetivos Específicos.	33
4. Metodología.....	33
4.1. Población de estudio	34
4.2. Unidades de análisis.....	36
4.3. Recolección de muestras, estandarización del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis y obtención de las preparaciones cromosómicas	36
4.4. Análisis microscópico de las preparaciones obtenidas mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis.	38
4.5. Análisis estadístico.....	40
4.6. Alcances del diseño propuesto.....	41
4.6.1. Validez interna.....	41
4.6.2. Validez externa.....	42

5.	Resultados.....	43
5.1.	Capacitación de participantes.....	43
5.2.	Estandarización del ensayo.....	43
5.3.	Caracterización de la muestra: variables ocupacionales, personales y de estilo de vida. 43	
5.4.	Pruebas de normalidad de los datos de frecuencia de MN	47
5.5.	Frecuencia de MN en la muestra estudiada.	48
5.6.	Regresión lineal múltiple de las variables de estudio.	49
6.	Discusión	54
6.1.	Análisis de variables ocupacionales de los participantes.	54
6.2.	Análisis de las frecuencias de MN.....	55
6.2.1.	Análisis univariado	56
6.2.2.	Análisis multivariado.	58
6.2.3.	Edad del participante.	59
6.2.4.	Sexo del participante.....	60
6.2.5.	Exposición a RI	61
6.2.6.	Limitaciones del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis.	65
6.2.7.	Variables no incluidas en los modelos finales de regresión lineal múltiple.....	66
7.	Conclusiones	67
8.	Recomendaciones	68
9.	Bibliografía.....	70
10.	Anexos.....	89
10.1.	Instrumento de recolección de datos.....	89
10.2.	Formula de Consentimiento Informado	95
10.3.	Resultados de evaluación de las preparaciones celulares del MNBC para análisis microscópico	98
10.4.	Propuesta programática: Curso básico sobre protección radiológica para personal ocupacionalmente expuesto de servicios de medicina veterinaria	101
10.5.	Versiones preliminares de los modelos de regresión lineal múltiple.....	106
10.5.1.	Muestra total	106
10.5.2.	Grupo expuesto	106
10.5.3.	Grupo no expuesto	107

Resumen

Las RIs son capaces de inducir un amplio espectro de tipos de daño al ADN, dentro de los cuales se encuentra la formación de MNs. En estudios radiobiológicos, se utiliza la frecuencia de MNs como biomarcador de daño genético radioinducido.

La presente investigación buscó determinar la utilidad del MNBC como biomarcador de daño al ADN producto de la exposición a distintos grados de radiaciones ionizantes. Se contó con la participación de 40 personas sanas, que formaban parte del personal de clínicas veterinarias o negocios afines ubicados dentro del Valle Central.

Mediante un análisis de regresión lineal múltiple se observó que al menos un tercio ($R^2 = 0,329$) de la variabilidad de la frecuencia de MN de la muestra general pueden explicarse mediante la influencia conjunta de la edad, el sexo y el nivel de exposición ocupacional a RI, en concordancia con lo informado en la literatura. La edad es la variable con mayor importancia relativa ($\beta=0,543$), seguido del sexo del participante ($\beta=-0,536$) y por último la cantidad de radiografías tomadas por día ($\beta=0,347$); la frecuencia de MN tiende a incrementarse conforme aumenta la edad del participante, en mujeres y a medida que el participante realice una mayor cantidad de radiografías.

Se concluye que el MNBC es una herramienta útil en el monitoreo del daño al ADN producto de la exposición ocupacional a RI en personal veterinario. Gracias al trabajo realizado, ahora se cuenta con la prueba de MNBC estandarizada, permitiendo su disponibilidad para futuras investigaciones que se realicen en el Servicio de Dosimetría Biológica del Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Dosis umbral para efectos determinísticos en exposición aguda a la radiación.	9
Cuadro 2. Estudios de biomonitoreo de POE mediante el CBMN	20
Cuadro 3. Distribución de la muestra según profesión o cargo ocupado en la clínica veterinaria o negocio afín.....	44
Cuadro 4. Distribución de la muestra según edad en años cumplidos	44
Cuadro 5. Distribución de la muestra según consumo de alcohol	45
Cuadro 6. Distribución del grupo en estudio según exposición a sustancias químicas	46
Cuadro 7. Características ocupacionales del grupo expuesto a radiaciones ionizantes.....	46
Cuadro 8. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para la frecuencia de MN en los grupos estudiados	47
Cuadro 9. Frecuencia de MN por cada 2000 células binucleadas para los expuesto y no expuesto	48
Cuadro 10. Frecuencias de MN por cada 2000 células binucleadas según el sexo del participante	49
Cuadro 11. Resumen del modelo de regresión lineal para la muestra total.....	49
Cuadro 12. Variables seleccionadas en el modelo de regresión lineal para la muestra total..	50
Cuadro 13. Resumen del modelo de regresión lineal múltiple para el grupo expuesto a radiaciones ionizantes.	51
Cuadro 14. Variables seleccionadas en el modelo de regresión lineal para el grupo expuesto a radiaciones ionizantes.	52
Cuadro 15. Resumen del modelo de regresión lineal múltiple para el grupo no expuesto a radiaciones ionizantes.	52
Cuadro 16. Variables seleccionadas en el modelo de regresión lineal para el grupo no expuesto a radiaciones ionizantes.....	53

Lista de figuras

Figura 1. Rol de la proteína p53 en la respuesta al daño radioinducido al ADN. Modificado de Gaziev & Shaikhaev (2012)	15
Figura 2. Vía canónica de reparación del daño radioinducido al ADN por unión de extremos no homólogos. Modificado de Bunting & Nussenzweig (2013).	17
Figura 3. Mecanismo general de formación de micronúcleos radioinducidos.....	23
Figura 4. Ejemplos de células binucleadas.....	40

Lista de gráficos

Gráfico 1. Histogramas de frecuencia de MN para el grupo expuesto sin y con transformación logarítmica.	47
Gráfico 2. Histogramas de frecuencia de MN para el grupo no expuesto sin y con transformación logarítmica.....	48

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATM: proteína ataxia telangiectasia mutada

ATR: proteína relacionada con la ataxia telangiectasia y Rad-3

CE β : coeficiente estandarizado β

DNA-PKcs: subunidad catalítica de quinasa dependiente de ADN

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

LNT: modelo lineal sin umbral (linear non-threshold model)

MDC1: proteína 1 mediadora del punto de control de daño al ADN

MN: micronúcleo(s)

MNBC: ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis

MRN: complejo compuesto por las proteínas MRE11/RAD50/NBS1

PIKK: quinasas relacionadas con la fosfoinositol 3-quinasa

POE: personal ocupacionalmente expuesto a radiaciones ionizantes

RI: radiaciones ionizantes

RDC: ruptura(s) de cadena doble(s) de la molécula de ADN

RSC: ruptura(s) de cadena simple(s) de la molécula de ADN

TC: tomografía computarizada



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Andres Chaves Campos, con cédula de identidad 1-1352-0704, en mi condición de autor del TFG titulado "Frecuencia de micronúcleos en personal expuesto y no expuesto a radiaciones ionizantes en clínicas veterinarias de San José en los años 2017, 2018 y 2019"

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Andres Chaves Campos

Número de Carné: 181744 Número de cédula: 1-1352-0704

Correo Electrónico: andreschaves_22@hotmail.com

Fecha: 05/11/2020 Número de teléfono: 8342-8613

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Vanessa Ramirez Mayorga


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. Introducción.

La práctica clínica en veterinaria ha mostrado una tendencia hacia la adopción cada vez mayor de técnicas diagnósticas que faciliten el manejo y desenlace de las patologías animales. Dentro de las técnicas adoptadas basadas en el diagnóstico por imagen se encuentra la radiografía, la fluoroscopia, la tomografía computarizada y otras metodologías cimentadas en el uso de radiaciones ionizantes (RI). En Costa Rica las técnicas de diagnóstico por imagen más utilizadas en veterinaria que involucran el uso de RI, son la radiología convencional y la tomografía computarizada (Camacho, 2017).

Como agentes físicos, las RI interactúan con la materia, y en específico con sistemas biológicos, a través de mecanismos específicos que consisten en una serie de eventos sucesivos, los cuales pueden llevar a efectos directos e indirectos sobre las biomoléculas orgánicas como peroxidación lipídica y daño oxidativo al ADN (Joiner, 2010; Wang et al., 2018).

El daño oxidativo en el ADN participa en numerosas condiciones y patologías como el envejecimiento y la carcinogénesis. Producto de la radiólisis del agua, los radicales $\bullet\text{OH}$ y otras especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno pueden inducir rompimiento de las cadenas de nucleótidos o modificaciones en las bases nitrogenadas, este mecanismo se conoce como efecto biológico indirecto de las radiaciones (Giaccia et al., 2012). Además de los mecanismos mencionados anteriormente, la RI como agente genotóxico puede actuar también a través de un mecanismo directo sobre las moléculas biológicas, causando un daño en su estructura. En el caso de las moléculas de ADN, sus bases nitrogenadas pueden absorber los fotones de radiaciones electromagnéticas, generando rupturas de cadena simple (SB) o cadena doble (DB) en la molécula de ADN (Cannan & Pederson, 2016).

La RI es capaz de producir un amplio espectro de daño al ADN dentro de los cuales se encuentran: daño a las bases nitrogenadas, roturas monocatenarias, roturas bicatenarias,

puntos carentes de base, formación de aductos entre el ADN y las proteínas, alteraciones cromosómicas como la formación de cromosomas dicéntricos, anillos céntricos, fragmentos acéntricos y translocaciones, además de otros efectos como la condensación prematura de los cromosomas, la formación de micronúcleos (MN) y de puentes nucleoplásmicos (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

El propósito de la presente investigación es determinar la utilidad del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis como biomarcador de daño al ADN por exposición a RI mediante el establecimiento de la frecuencia de micronúcleos en personal con distintos grados de exposición a rayos X que laboran en clínicas veterinarias o afines.

También pretende fomentar la capacitación de este personal en buenas prácticas de seguridad radiológica que permitan disminuir el daño al ADN que se podría presentar durante su práctica laboral, además de concientizar al personal que ahí labora en temas de protección radiológica y fundamentos de los efectos biológicos de las radiaciones.

2. Situación actual del conocimiento.

2.1. Rayos X

Luego de su descubrimiento por Wilhelm Röntgen en 1895, los rayos X se han investigado en función de sus múltiples aplicaciones en el quehacer humano. Si bien en medicina humana la aplicación de la gran variedad de técnicas de imagen ha sido ubicua, en veterinaria su aplicación ha sido más cauta. Los tres métodos por imagen más empleados por la medicina veterinaria a nivel mundial son la ecografía, la radiografía y la tomografía computarizada (Kiessling & Pichler, 2017).

La ecografía es un método de imagen que utiliza ondas mecánicas, donde las ondas de ultrasonido son producidas de forma artificial mediante el efecto piezoeléctrico con una frecuencia de entre 1-2 MHz en el ultrasonido terapéutico, y 2-12 MHz en el ultrasonido diagnóstico (Nájera & Arribas, 2015).

Las técnicas radiográficas (radiodiagnóstico convencional, radiología digital, fluoroscopia y la tomografía computarizada) hacen uso de RI, específicamente rayos X. En el caso del radiodiagnóstico convencional, los rayos X luego de interactuar con la anatomía del paciente o con la estructura del objeto a radiografiar, incide sobre una placa de celuloide cubierta con una emulsión de bromuro de plata que cambia al recibir la RI (Huda, 2016). La radiología digital, tal como su nombre indica, permite la obtención de imágenes directamente a un formato digital mediante el uso de receptores o soportes de imagen que sustituyen los chasis con placas con emulsión de bromuro de plata (Nájera & Arribas, 2015).

La tomografía computarizada (TC) fue invención de Godfrey Hounsfield en 1972. Las bases de la TC se conducen bajo los principios matemáticos desarrollados por Radón en 1917 que plantearon la posibilidad de crear una imagen de un objeto conocido teniendo un número infinito de proyecciones a través del objeto. De esta manera la TC adquiere un número

determinado de proyecciones desde distintos ángulos mediante el uso de un juego de tubo de rayos X y detectores, los cuales se mueven alrededor del sujeto u objeto a explorar. La RI emitida por el tubo interactúa con el sujeto colocado sobre la camilla de estudio (y con la misma camilla), experimentando una atenuación proporcional a la densidad de los materiales con los que interactuó (Bushberg et al., 2012).

2.2. Física básica de los rayos X.

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas que pueden ser consideradas como oscilaciones en los campos eléctricos y magnéticos y suelen ser descritas en términos de sus propiedades de longitud de onda, frecuencia o energía. La velocidad (c), la longitud de onda (λ) y la frecuencia (f) son inversamente proporcionales y se relacionan mediante las ecuaciones de Maxwell de la siguiente manera (Nájera & Arribas, 2015):

$$c = \lambda * f$$

Ecuación 1. Ecuación de Maxwell.

Las ondas electromagnéticas emitidas en forma de radiación toman magnitudes discretas llamados “cuantos” o “fotones” los que podrían considerarse como pequeños “paquetes de energía”. La energía de un cuanto es proporcional a su frecuencia y la relación entre energía y longitud de onda está descrita por la ecuación de Planck (Huda, 2016):

$$E = h * f = \frac{hv}{\lambda} = 1 J (Julio)$$

Ecuación 2. Ecuación de Planck

En la ecuación 2, E representa la energía de la onda electromagnética, " h " representa la constante de Planck ($h = 6.625 \times 10^{-34}$ Julios-segundos), " v " es la velocidad de propagación de la onda electromagnética (para el vacío es igual a 2.998×10^8 m/s) y λ la longitud de onda (Bushberg et al., 2012).

De esta manera, los diferentes tipos de radiación electromagnética difieren entre sí por sus propiedades de frecuencia y longitud de onda, mientras que la velocidad es la misma dependiendo solo del medio en el cual se propaguen. Las distintas categorías de las ondas electromagnéticas que incluyen las ondas de radio, televisión, microondas, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos gamma y rayos X, constituyen lo que se conoce como espectro electromagnético. Las radiaciones que componen el espectro electromagnético pueden ser clasificadas en dos grandes grupos RI y no ionizantes (Nájera & Arribas, 2015).

Las RI poseen energía suficiente como para producir la ionización de átomos y moléculas con los que interactúe, de esta manera induciendo cambios estructurales o conformacionales que, en el caso de la biomoléculas y sistemas biológicos, pueden favorecer afecciones a la salud (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016).

En el caso de los rayos X, estos son producidos a través de dos fenómenos: radiación característica y radiación de frenado. En los equipos utilizados para la producción de imágenes radiográficas, los rayos X son generados a través de ambos fenómenos produciendo un espectro característico de los rayos X que correspondería a la superposición de los espectros producidos por la radiación de frenado y la radiación característica (Nájera & Arribas, 2015). De ambos, la radiación de frenado (en alemán "*Bremsstrahlung*") es el que produce la mayor parte de los rayos X en equipos de uso médico. Este fenómeno involucra la interacción de electrones energéticos con los campos eléctricos de los núcleos de los átomos que componen un blanco anódico. Los electrones son desacelerados por el campo eléctrico nuclear sufriendo

deflexión, la energía perdida cuando el electrón es desacelerado se emite en forma de un fotón de rayos X. La radiación de frenado produce un espectro continuo de energías hasta un valor máximo (Huda, 2016).

En el caso de la radiación característica, los electrones deben interactuar con electrones del blanco anódico llevando a su excitación y produciendo un espacio disponible o “hueco” en el orbital el cual será ocupado por un electrón de capas más energéticas que luego emite el exceso de energía en forma de radiación X (Huda, 2016).

La radiación emitida desde una fuente experimenta una atenuación proporcional a la densidad y ancho de los materiales con los que interactúa. Si el haz de radiación es monoenergético o cercano a serlo, la transmisión de los rayos X a través de un objeto se describe bajo la relación matemática mostrada a continuación (Bushberg et al., 2012):

$$I = I_0 e^{-\sum_{i=1}^n \mu_i x_i}$$

Ecuación 3. Ley exponencial de la atenuación de un haz de fotones.

En donde I es la intensidad final del haz, I_0 es la intensidad del haz previa a la interacción con el paciente y el término $\sum_{i=1}^n \mu_i x_i$, es la sumatoria de los productos de los coeficientes de atenuación y el ancho de cada una de regiones del objeto con distinto coeficiente de atenuación lineal (el cual refiere al porcentaje de radiación incidente que es atenuada). De la ecuación 3 se concluye que se observa una reducción neta en el número de rayos X que permanece en un haz de rayos X luego de su penetración a través de un espesor de material. A este fenómeno se le conoce como atenuación de los rayos X y depende de características propias de cada material (Bushberg et al., 2012).

En el caso de la medicina veterinaria, la anatomía del animal provee de estructuras de distintos coeficientes de atenuación que producirán absorciones específicas de los fotones, los rayos X atenuados luego de salir del animal llegarán a un receptor de imagen analógico o digital que mediante procesos propios de cada tecnología permitirá la formación de la imagen radiográfica.

Cuando un amplio haz de rayos X incide en cualquier tejido, algunos de los rayos X se absorben, otros siguen su trayectoria y otros se dispersan. El personal veterinario, imagenólogos o personal técnico a menudo sujeta al animal durante el procedimiento radiográfico y pueden estar expuestos al haz principal de radiación así como a radiación dispersa (Camacho, 2017).

2.3. Riesgo radiobiológico

El efecto biológico inducido por RI está determinado por las propiedades físicas de la radiación (carga eléctrica, energía, transferencia lineal energética) pero de igual forma influyen otros factores como la tasa de dosis de exposición y el tipo, volumen, oxigenación, vascularización, tasa de proliferación celular del tejido irradiado (Kumar et al., 2014). A nivel celular, podemos clasificar el daño radioinducido al ADN en letal o subletal.

El daño letal radioinducido al ADN es irreparable, comprometiendo de forma irreversible la funcionalidad o viabilidad celular y llevando a muerte celular durante interfase o a la incapacidad de la célula para dividirse (muerte mitótica) (Sacristán, 2015).

El daño celular subletal no conlleva a la muerte celular y no interfiere en la proliferación celular. Una célula que haya experimentado daño subletal al ADN puede tener tres posibles desenlaces (Giaccia et al., 2012):

1. Reparación completa del daño, llevando a la supervivencia celular.

2. Reparación incompleta del daño, las modificaciones serán retenidas en el genoma celular y heredadas a la progenie celular.
3. No reparación del daño: varias lesiones subletales acumulativas pueden llevar a un daño no reparable de tipo letal.

Ahora bien, según la naturaleza del daño producido por la radiación en las células, los efectos biológicos pueden clasificarse en efectos determinísticos y efectos estocásticos. En el caso de los efectos estocásticos, se considera que no existe un umbral de dosis para su ocurrencia. Además, el daño puede darse en un grupo de células o en una sola célula, por lo que incluso una sola célula irradiada sobreviviente con una modificación en su genoma tiene potencial de transformación maligna. La probabilidad de que un individuo padezca de cáncer como efecto estocástico aumenta de manera proporcionalmente lineal a la dosis de RI a la que es expuesto; comportamiento conocido como modelo lineal sin umbral (LNT, por sus siglas en inglés: linear non-threshold model) (International Atomic Energy Agency, 2010).

Los efectos deterministas se producen por la muerte de un número elevado de células, lo que se asocia a una pérdida de función según el tejido u órgano afectado, la dosis y el volumen irradiado. Para que se dé el daño determinista, se requiere de un umbral mínimo de dosis de exposición (Huda, 2016). Además, la severidad del daño, aumenta con la dosis de radiación (International Atomic Energy Agency, 2010). En el cuadro 1 se muestran ejemplos de efectos determinísticos para órganos específicos y según su dosis umbral efectiva para una exposición única.

Los límites de dosis se han determinado de acuerdo al peligro a la salud por efectos estocásticos y en base a la dosis umbral (Hamada & Fujimichi, 2014). La respuesta clínica final a una exposición por encima de la dosis umbral varía según el órgano, por ejemplo, pericarditis, nefritis, tiroiditis, necrosis en sistema nervioso y en gran variedad de tejidos (Joiner, 2010),

otros efectos tempranos a la radiación, según región u órgano del cuerpo irradiada, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Dosis umbral para efectos determinísticos en exposición aguda a la radiación.

Órgano	Efecto	Dosis efectiva única (Sv)
Gónadas	Esterilidad	0.1 (temporal), 3.6 (permanente)
Ojos	Cataratas	0.5
Médula ósea	Depresión de médula	0.5
Piel	Eritema transitorio	2
	Descamación	2 a 10
	Pérdida temporal de cabello	4
	Necrosis dérmica	25

Fuente: Adaptado de Cronenwett, J., & Johnston (2018).

La ocurrencia de efectos biológicos determinísticos y estocásticos producidos a altas dosis de radiación se encuentran ampliamente descritos, sin embargo, a bajas magnitudes (exposiciones comunes en radiodiagnóstico médico) la relación dosis-efecto se vuelve más compleja de describir (Vaiserman, 2010). Es parte de la discusión actual si el modelo LNT (a mayor dosis mayor probabilidad de riesgo) describe con precisión los efectos a bajas dosis de radiación; incluso ciertos autores describen la posibilidad de un efecto “hormesis” en este tipo de exposiciones (Doss, 2013). La hormesis se puede definir como todos aquellos efectos fisiológicos o bioquímicos que ocurren a bajas dosis y no pueden ser anticipados por extrapolación de los efectos tóxicos ocurridos a altas dosis (Baldwin & Grantham, 2015).

Las dosis de radiación involucradas en radiología diagnóstica, a excepción de

procedimientos intervencionistas (basados en técnicas guiadas por fluoroscopia), son raramente suficientes como para asociarse con efectos determinísticos. A estos bajos niveles de dosis los riesgos radiológicos se circunscriben a efectos estocásticos esencialmente de tipo somático, representados principalmente en un incremento a largo plazo en la incidencia de cáncer (Huda, 2016).

Los MN radioinducidos son resultado de un daño subletal para la célula, permitiendo la consecución del ciclo celular hasta la mitosis y llevando a una mala segregación de los cromosomas o fragmentos cromosómicos durante la anafase. Por lo tanto, los MN son biomarcadores que pueden representar eventos tempranos radioinducidos (daño al ADN e inestabilidad genómica) que a largo plazo pueden vincularse con un mayor riesgo de aparición de efectos estocásticos.

2.4. Fundamentos de radiobiología celular y molecular.

La radiobiología estudia los efectos de la exposición controlada de RI en células y modelos animales experimentales, así como de información recabada de los efectos en humanos luego de exposiciones accidentales. Como agentes físicos, las RI interactúan con la materia, y en específico con sistemas biológicos, a través de mecanismos que consisten en una serie de eventos sucesivos y que pueden ser divididos en tres etapas:

1. Etapa física: las interacciones iniciales de la radiación con el material biológico conducen a eventos de ionización y excitación, dentro de un rango de los $10^{-16} - 10^{-14}$ segundos (Chapman & Nahum, 2015).
2. Etapa química: los electrones producidos por ionización tienen la capacidad de generar radicales libres $\bullet\text{H}$ y $\bullet\text{OH}$, mediante la radiólisis del agua. Estos radicales pueden generar especies reactivas basadas en el oxígeno (ROS) y en el nitrógeno, las que pueden

generar daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las ROS se encuentran con una serie de barreras antioxidantes que neutralizan su capacidad reactiva y finalizan las reacciones de oxidación. Estos eventos asociados a radicales libres finalizan aproximadamente a 1 ms posterior a la exposición (Joiner, 2010).

3. Fase biológica: el estrés oxidativo es definido como un “desbalance entre especies oxidativas y antioxidantes, favoreciendo la oxidación” y presenta un riesgo potencial de daño para distintas biomoléculas (Grether-Beck et al., 2000). Los eventos de la fase biológica incluyen todos los procesos que inician posterior a ese daño y que inician con reacciones enzimáticas que actúan sobre el daño químico residual (Joiner, 2010).

La mayoría de las proteínas dañadas por oxidación son marcadas para degradación endógena, principalmente mediante ubiquitinación dependiente de ATP, pocos mecanismos celulares están involucrados en proveer protección específica ante la oxidación proteica o que actúen en la reparación de proteínas dañadas. El reciclaje de proteínas oxidadas es un mecanismo necesario para evitar la acumulación de proteínas no funcionales; los aminoácidos no oxidados son liberados para ser reutilizados en la síntesis de nuevas proteínas (Reisz et al., 2014).

Por otro lado, la peroxidación de lípidos es una causa importante de daño y muerte celular inducida por radicales libres y especies reactivas; ésta consiste en reacciones en cadena donde oxidantes fuertes causan rompimiento de fosfolípidos de membrana que contienen ácidos grasos poliinsaturados. El daño por peroxidación lipídica a las membranas biológicas puede tener varios niveles de severidad dependiendo de la naturaleza y concentración del oxidante, pudiendo darse desde una disminución en la fluidez de la capa hasta la ruptura de la membrana celular (Reisz et al., 2014).

El daño oxidativo a la membrana puede tener numerosas consecuencias, un influjo

descontrolado de Ca^{2+} hacia el citoplasma provoca activación o desactivación inadecuada de enzimas, aumento en los niveles de ONOO- mediante la estimulación de la óxido nítrico sintasa (NOS), daño mitocondrial, alteración del funcionamiento de la cadena respiratoria (asociada a una producción deficiente de ATP) y la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana celular (Grether-Beck et al., 2000).

La RI como agente genotóxico puede actuar sobre el ADN (y demás biomoléculas) de forma directa depositando su energía en los átomos de la molécula que interactúa o indirectamente a través de la producción de radicales libres. La célula, como respuesta al daño al ADN, inicia una serie de mecanismos dirigidos a la activación de puntos de control del ciclo celular, reparación del daño, así como señales de sobrevivencia o apoptosis (Joiner, 2010).

2.4.1. Respuesta al daño radioinducido del ADN.

El daño radioinducido al ADN resulta en la activación de vías moleculares que permiten identificar los sitios de daño (sensores moleculares) e iniciar una respuesta ante este estímulo (efectores moleculares). El complejo MRN, la ATM, la ATR y las DNA-PKcs actúan como principales sensores del daño al ADN y tienen un rol fundamental en la activación de numerosas moléculas señalizadoras (γH2AX , MDC1, RAP80, 53BP1, KAP-1, BRCA1, CHK2, p53, KAP-1, CDC25, entre otras), las cuales activan vías de moléculas efectoras que determinan el desenlace que tendrá la célula, las moléculas efectoras activadas pertenecerán a tres vías principales de respuesta: 1) Vías de reparación del ADN, 2) Control del ciclo celular y 3) Apoptosis.

2.4.1.1. Vías de las PIKKs en la respuesta al daño radioinducido al ADN.

La respuesta al daño radioinducido, es coordinado por PIKKs: la proteína ATM y las DNA-

PKcs. Existe evidencia que sugiere la participación de ERKs en los procesos de activación adecuada de los puntos de control, así como en la reparación del ADN (Lin et al., 2013).

En células de mamíferos, el complejo MRN se une a fracturas de doble cadena del ADN y facilita la activación de ATM. En el sitio de la lesión, la ATM se autofosforila y posteriormente fosforila el residuo de serina 139 (S139) de las histonas H2AX, llevando a la formación de la variación histónica γ H2AX (Vignard et al., 2013). La fosforilación de S139 promueve el reclutamiento de MDC1 que media el reclutamiento de MRN y ATM adicional, así como en el reclutamiento de las proteínas RAP80, 53BP1, KAP-1, BRCA1 (Reinhardt & Yaffe, 2013), lo que lleva a una mayor fosforilación de H2AX y a la acumulación de estas proteínas en el sitio de daño. El reclutamiento y agregación de estas proteínas forman focos que se extienden por varias megabases en la cromatina (Ivashkevich et al., 2012).

Estas vías de señalización conducen a la fosforilación de las proteínas CHK2, p53, KAP-1 y CDC25, y promueven el arresto celular en G1 o G2, lo que permite la reparación del daño radioinducido (Reinhardt & Yaffe, 2013).

Existe otra vía de señalización capaz de fosforilar la histona H2AX en el residuo S139: la vía DNA-PKcs-KU (Vignard et al., 2013).

La DNA-PK está compuesta de una subunidad catalítica (DNA-PKcs) y de una subunidad de interacción con las moléculas diana (el heterodímero, Ku70-Ku80). La subunidad catalítica media la fosforilación de las histonas H2AX. Además, esta quinasa es importante en la vía de recombinación no homóloga para la reparación del ADN (Freeman & Monteiro, 2010). La vía de ATM podría considerarse la que presenta el papel de mayor importancia en la respuesta a las fracturas de la doble cadena de ADN, siendo el regulador maestro en la respuesta del daño a la radiación (Joiner, 2010).

2.4.1.2. Rol de la proteína p53 en la respuesta al daño radioinducido al ADN.

La proteína p53 tiene un rol fundamental en la regulación del ciclo celular y en el mantenimiento de la estabilidad genómica; es un factor de transcripción normalmente expresado a bajos niveles debido a su interacción con la ubiquitina ligasa E3, MDM2. Múltiples factores genotóxicos pueden inducir la fosforilación de p53 y la consecuente liberación de MDM2; de esta forma p53 es fosforilada poco después de la activación de las vías de las PIKKs. Una vez fosforilada, p53 tiene múltiples genes diana, los cuales codifican para proteínas que participan en mecanismos de arresto temporal del ciclo celular (quiescencia), permitiendo la reparación del ADN dañado, arresto permanente del ciclo celular (senescencia), lo que previene la transmisión de mutaciones a células hijas y apoptosis (muerte celular programada) (Campbell et al., 2013).

El dominio rico en prolina (PRD) de p53 se ha reportado como esencial en la inducción de la apoptosis. Sin embargo, parece ser que estos dominios son importantes para que p53 responda eficientemente a algunos estímulos de estrés, pero no necesariamente a todos. De esta manera, ciertos estímulos como la hiperoxia y la RI activan a p53 mediante vías distintas, siendo predominante la activación radioinducida de p53 mediante la vía de la ATM (Campbell et al., 2013). La vía intrínseca de la apoptosis inicia por la activación radioinducida de p53 llevando a la activación posterior de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, que inducen a la liberación del citocromo c de la mitocondria, el cual forma el apoptosoma al formar un complejo junto con APAF-1. El apoptosoma se une con la caspasa 9 iniciadora, que corta a la caspasa 3; esta última es la responsable del proceso de apoptosis (Panayi et al., 2013).

Como se muestra en la figura 1, p53 también es capaz de inducir disfunción mitocondrial de manera directa o indirecta (mediante desregulación de moléculas antioxidantes). Esta disfunción lleva a ciclos de daño al ADN, activación de p53, compromiso mitocondrial y

aumento en la producción de ROS (Sahin & Depinho, 2010).

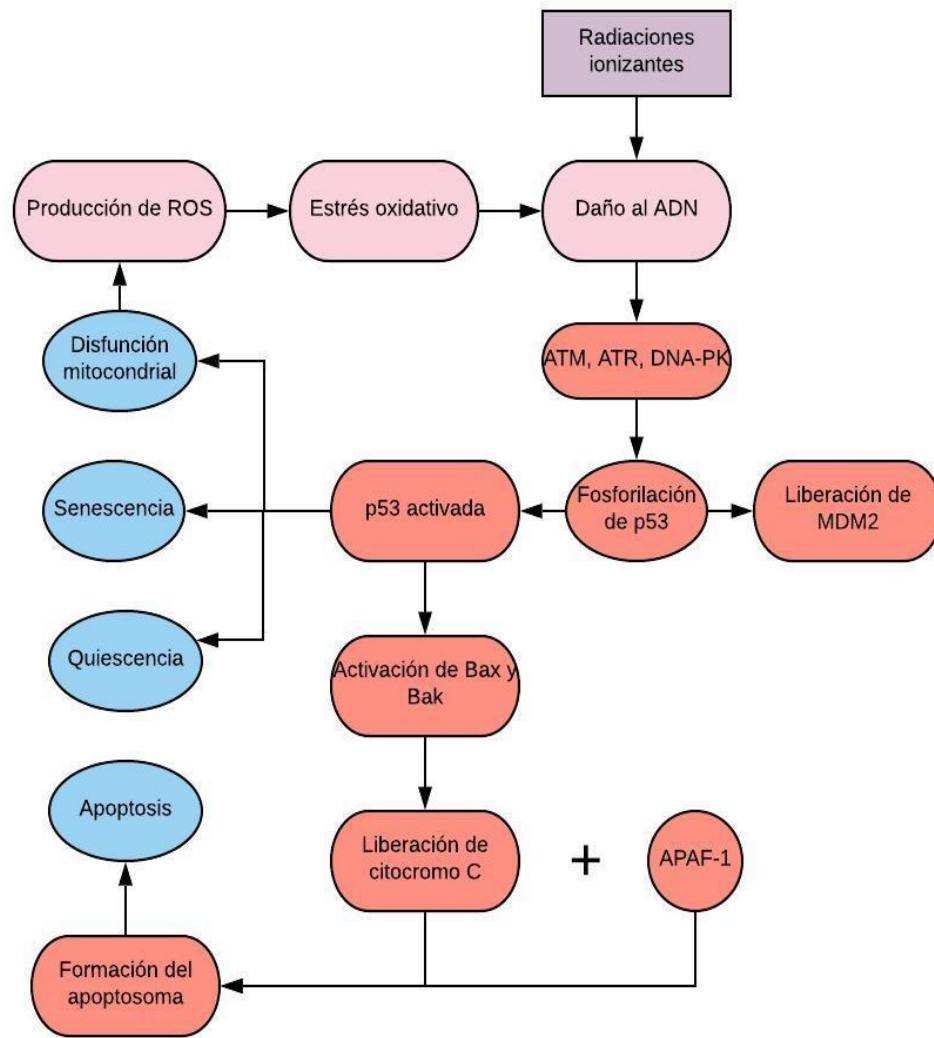


Figura 1. Rol de la proteína p53 en la respuesta al daño radioinducido al ADN. Modificado de Gaziev & Shaikhaev, (2012).

2.4.1.3. Vías de reparación de rupturas radioinducidas en el ADN.

Se considera que el mecanismo predominante para la reparación de rupturas de doble cadena del ADN ante eventos radioinducidos es la recombinación no homóloga. En células de mamíferos, este proceso requiere del heterodímero Ku (Ku70/80) que reconoce la ruptura y recluta a la subunidad catalítica de la DNA; este complejo se une a ambos extremos de la

ruptura y a su vez recluta la nucleasa Artemis, la que procesa los extremos dañados haciéndolos compatibles y ligables; posteriormente los extremos serán unidos por la ligasa IV/XRCC4/XLF (Rassool & Tomkinson, 2010). Este mecanismo es susceptible a errores debido a que la fractura no es reparada utilizando un molde homólogo y por lo tanto se pueden producir pequeñas deleciones o inserciones, particularmente cuando los extremos de DSB son modificados. Generalmente la recombinación no homóloga permanece activa durante todo el ciclo celular, pero predomina durante las fases G1 y fase S temprana (figura 3) (Mahaney et al., 2009).

La reparación a través de la vía por recombinación homóloga actúa en la segunda mitad del ciclo celular, (S tardía y fase G2) y utiliza una cromátida hermana sin daños como molde. El complejo MRN y la exonucleasa CtIP facilitan la resección de cadenas en dirección 5'-3' desde el extremo de la DSB, creando una cadena de ADN simple en la cual se formará el filamento de nucleoproteínas RAD51, donde proteínas RPA son reclutadas lo que permite la unión de los extremos de la cadena. De seguido las proteínas RPA son reemplazadas por proteínas RAD51, formando el filamento núcleo proteico, el cual monitorea el ADN de doble cadena en busca de secuencias homólogas. Posterior, se utiliza el extremo 3' de la cadena invadida como cebador, la extensión del cebador se da por acción de polimerasas η y ν . Luego del apareamiento de secuencias homólogas, los extremos son unidos mediante la acción de una enzima ligasa (Kelley & Fishel, 2016).

Las respuestas celulares permiten por un lado la reparación del daño, pero en caso de que estas respuestas sean ineficaces o insuficientes, la exposición a RI puede llevar a la aparición de efectos secundarios de diversa índole en el individuo pues dependen de la dosis, tipo de radiación y la zona del organismo que haya sido irradiada.

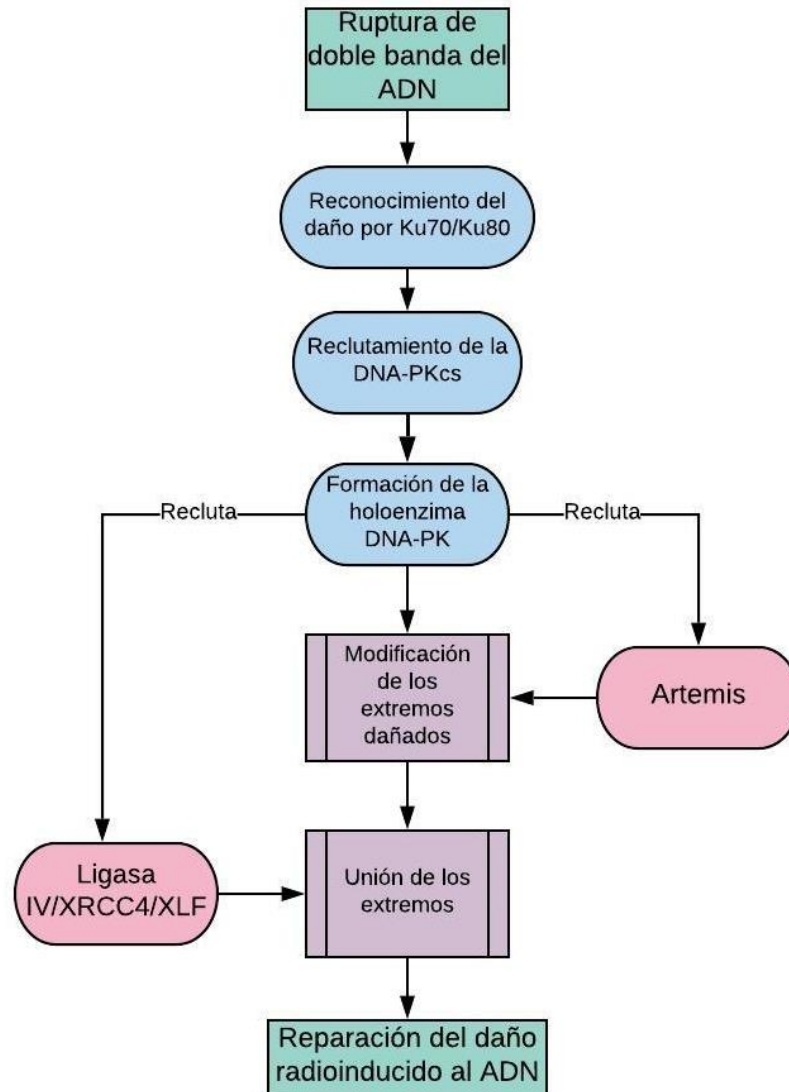


Figura 2. Vía canónica de reparación del daño radioinducido al ADN por unión de extremos no homólogos. Modificado de (Bunting & Nussenzweig, 2013).

2.5. Ensayo de micronúcleos en la evaluación de la genotoxicidad de las radiaciones ionizantes.

El daño radioinducido al material genético puede ser registrado mediante distintos métodos citogenéticos. Estos ensayos constituyen una herramienta auxiliar en la protección radiológica y un instrumento fundamental en la investigación en el campo de la radiobiología. Muchos de estos ensayos son utilizados en la estimación de la dosis de radiación que un

individuo ha recibido, procedimiento conocido como dosimetría biológica. Sin embargo, para tal estimación es necesario conocer la relación o curva dosis respuesta que se asocia a la aparición de los biomarcadores que serán utilizadas como biodosímetro (Suto et al., 2015a). De manera general, los biomarcadores son parámetros biológicos que brindan información sobre el estado fisiológico o patológico de un individuo o población (Torres-Bugarín et al., 2014).

Los principales ensayos utilizados para la detección de daño cromosómico radioinducido son el ensayo de cromosomas dicéntricos, el ensayo de MN con bloqueo de la citoquinesis (MNBC), el ensayo de translocación cromosómica por FISH, ensayo de focos γ -H2AX y de perfiles de expresión genómica (Baeyens et al., 2011).

Los ensayos mencionados (a excepción de perfil genómico y los focos γ -H2AX) se basan en la descripción del efecto de la radiación en relación a la frecuencia de una aberración cromosómica inducida por la exposición (Milosević-Djordjević et al., 2010; Özdal et al., 2016; Wolff et al., 2011).

Se han propuesto numerosos biomarcadores para su aplicación en modelos de predicción y evaluación del riesgo de cáncer, el uso de estos biomarcadores podría ser una oportunidad para la detección temprana y una disminución de la morbilidad y mortalidad asociada al cáncer (Calzone, 2012).

Entre los diferentes biomarcadores que existen, la frecuencia de MN es ampliamente utilizada en investigación de genotoxicidad básica y aplicada, incluyendo el área clínica y la dosimetría biológica, siendo muy utilizado en la evaluación de daño genético como consecuencia de riesgos ambientales u ocupacionales, también es utilizado como marcador de inestabilidad genómica (Torres-Bugarín et al., 2014). Como biomarcador de efecto temprano, el MNCB permite la detección de daño genético incluso antes de que ocurran los posibles desenlaces patológicos producto de este daño.

Los MN son formaciones extranucleares que contienen fragmentos acéntricos, fragmentos cromatídicos acéntricos o cromosomas enteros no incorporados en el núcleo de la célula hija luego de la división celular, ya que no se unieron adecuadamente al huso mitótico durante la anafase. Se encuentran envueltos por una membrana nuclear, por lo que toman la apariencia de un núcleo de un menor tamaño al núcleo principal, y están ubicados en la cercanía de este último. Agentes genotóxicos, como las RI, son capaces de inducir MN (Luzhna et al., 2013a).

Fenech y Morley (1985) describieron por primera vez el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC), técnica citogenética que permite la identificación de células binucleadas con MN, las cuales se han dividido una vez. Las células son tratadas con citocalasina B, agente inhibidor del ensamblaje de microfilamentos, permitiendo la cariocinesis e inhibiendo la citocinesis durante la mitosis. Para este ensayo es común obtener muestras de linfocitos periféricos, células epiteliales (mucosa bucal y nasal) y fibroblastos (Falck, 2014).

El cuadro 2 muestra ejemplos de estudios de biomonitoreo con MNBC en personal ocupacionalmente expuesto a radiaciones ionizantes (POE) a RI, que registraron un aumento en la frecuencia de MN con respecto a grupos no expuestos:

Cuadro 2. Estudios de biomonitorio de POE mediante el CBMN

Grupo/Características	N	Edad promedio ±DE (años)	Área de trabajo	Exposición (años)	MN	Valor de p	Referencia
Francia							
No expuesto	69	44.2 ± 9.0	-	-	14.3 ± 7.2*	0.011	Sari-Minodier et al., 2007
Expuesto	132	43.6 ± 8.4	Radioterapia, medicina nuclear, cardiología intervencionista, sala de operaciones pediátricas radiodiagnóstico	16.5 ± 8.5	17.0 ± 9.9*		
Colombia							
No expuesto	31	35 (32-40.5)	-	-	4 (2.4- 8) **	<0.05	(Sierra, 2011)
Expuesto	31	36 (31-41.5)	Radiología intervencionista (Ortopedia)	7 (5-12)	11(7.3- 19.8) **		
Irán							
No expuesto	35	36.6 ± 4.2	-	-	11.8 ± 6.5***	< 0.01	(Farideh Zakeri & Hirobe, 2010a)
Expuesto	32	38.2 ± 3.7	Radiología intervencionista	7.2 ± 5.8	21.5 ± 9.6***		
	36	37.3 ± 5.4	Medicina nuclear	8.5 ± 5.1	19.7 ± 3.8***		
	33	35.7 ± 4.2	Radiodiagnóstico	9.2 ± 6.3	16.8 ± 8.1***		
Macedonia							
No expuesto	20	18±2.2	-	-	4.5 ± 3.52***	<0.05	(Velickova et al., 2015)
Expuesto	20	45±1.5	Radiodiagnóstico	15-35	14.5 ± 5.51***		

*CMN/1000CBN: total de células micronucleadas por cada 1000 células binucleadas

**MNs/2000 CBN: total de micronúcleos por cada 2000 células binucleadas

***MNs/1000CBN: total de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas

2.6. Causas de la inducción de micronúcleos por radiaciones ionizantes.

Las RI interactúan con la materia y con sistemas biológicos, a través de una serie de eventos sucesivos, los cuales pueden llevar a efectos sobre las biomoléculas como peroxidación lipídica y daño oxidativo al ADN. Entre los daños al ADN producto de las RI se encuentran: mutaciones, entrecruzamiento entre el ADN y proteínas, roturas bicatenarias, alteraciones cromosómicas como la formación de cromosomas dicéntricos, anillos céntricos, fragmentos acéntricos, translocaciones y MN (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

La técnica de MNBC permite detectar el daño producido tanto por sustancias químicas como físicos, los cuales a su vez pueden tener efectos de tipo clastogénico o aneugénico. Los clastógenos (como las RI y radiaciones ultravioletas) inducen la formación de MN que incluyen fragmentos acéntricos cromosómicos o cromatídicos (centrómero-negativos) (Kisurina-Evgenieva et al., 2016). Mientras que los agentes aneugénicos (como la vincristina) llevan a MN que contienen cromátidas o cromosomas completos (centrómero-positivos) (Fenech et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2011a; Kisurina-Evgenieva et al., 2016; Sabharwal et al., 2015). La mayoría de MN radioinducidos se originan a partir de fragmentos acéntricos; mediante variaciones del MNBC que incluyen el uso de sondas pancentroméricas, es posible discriminar entre MN centrómero negativo y positivo (Vral et al., 2011).

Existe una inclusión preferencial en MN radioinducidos de fragmentos producto de la ruptura de los cromosomas humanos de mayor tamaño. Balajee y colaboradores (2014) irradiaron muestras de sangre de sujetos sanos en un rango de dosis entre 5-10 Gy. Mediante el uso de hibridación fluorescente *in situ* multicolor registraron entre 3 a 6 señales multicolor en los MN. Del total de MN entre un 35-45% de las señales corresponden con cromosomas

del grupo A (1, 2, 3) y del grupo B (4, 5), en forma única o combinados. Durante la interfase, los cromosomas de los grupos A y B constituyen el blanco de mayor volumen para las RI, de tal forma que éstos tienden a tener una mayor cantidad de rupturas de doble cadena (RDC) y, por lo tanto, incluirse preferencialmente en los MN.

2.6.1. Rupturas de la molécula de ADN.

La RI es capaz de producir rupturas de cadena simple (RSC) y cadena doble (RDC) mediante la colisión directa del fotón o partícula con la molécula de ADN. No obstante, ocurre con mayor frecuencia un daño indirecto a raíz de la interacción de especies reactivas del oxígeno (principalmente radicales $\bullet\text{OH}$ producto de la radiólisis del agua) con el ADN, llevando a la ruptura de los enlaces fosfodiéster (Giaccia et al., 2012).

La respuesta celular a la exposición con RI incluye vías de reparación que permiten solventar gran proporción de RSC y RDC radioinducidas en la molécula de ADN. Sin embargo, la posibilidad de que algunos de estos eventos no se reparen correctamente, conduce a células con daños que persisten hacia la mitosis. La presencia de una o dos RDC en una misma molécula produce fragmentos de ADN, los cuales no serán segregados correctamente durante la anafase y pueden conducir a la formación de MN.

La formación de RSC juega un papel relevante en la inducción de MN, ya que si estas no son reparadas correctamente pueden derivar en RDC (Khoronenkova & Dianov, 2015). Si una RSC se encuentra con una horquilla de replicación durante la fase S, esto lleva al colapso de la horquilla y a la formación de una RDC (Joiner, 2010). Durante la fase S, la recombinación homóloga (RH) se considera el principal mecanismo de reparación, existiendo la disponibilidad de secuencias homólogas complementarias provenientes de cromátidas hermanas cercanas (Lieber, 2010). Las RI pueden inducir RSC principalmente a través de daño oxidativo por

radicales libres, la coincidencia de dos RSC a una distancia de hasta 10 pares de bases puede devenir en una RDC y por lo tanto en la interrupción en la continuidad de la molécula de ADN (Schipler & Iliakis, 2013).

Las RDC son reparadas mediante dos vías principales: la unión de extremos no homólogos (UENH) y la RH, siendo la UENH el principal mecanismo de reparación de las RDC (Lomax et al., 2013).

A pesar de que las vías de respuesta al daño radioinducido al ADN son capaces de resolver gran parte del daño inicial, algunas células con RDC o con reordenamientos continúan hacia la mitosis. Por lo tanto, la incapacidad de reparar adecuadamente múltiples RDC radioinducidas, pueden llevar a reordenamientos cromosómicos mediante intercambios cromosómicos y cromatídicos de tipo simétrico o asimétrico, así como a la formación de fragmentos acéntricos que luego no se unen correctamente al huso mitótico durante la anafase y son envueltos por una membrana nuclear, dando lugar a MN (Fenech et al., 2011). El mecanismo de formación radioinducida de MN se ilustra en la figura 3.

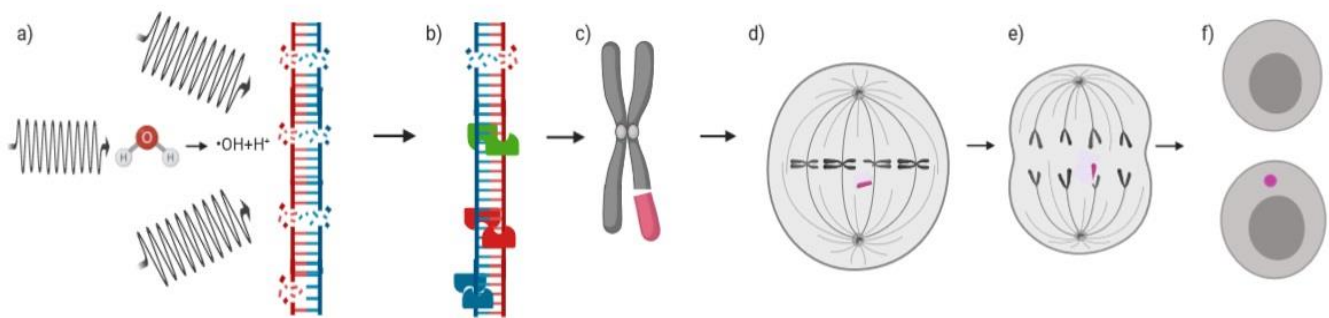


Figura 3. Mecanismo general de formación de micronúcleos radioinducidos. a) Las RI (líneas negras onduladas) pueden producir SSB (puntos rojos) y DSB (puntos rojos y azules) a través de un efecto directo y un efecto indirecto mediado por radicales libres. b) SSB es reparado por escisión de bases (BER) (enzimas azules) mientras que las DSB son reparadas principalmente por NHEJ (enzimas rojas) y HR (enzimas verdes), algunos daños pueden permanecer sin ser reparados (puntos rojos y azules). c) La presencia de DSB puede conducir a la formación de fragmentos acéntricos cromatídicos o cromosómicos (fragmento color rosa). d) Aquellos fragmentos acéntricos (fragmento color rosa) que persistan hasta la mitosis no serán capaces de interactuar con los microtúbulos del huso mitótico. e) Durante la anafase estos fragmentos (color rosa) quedarán rezagados mientras que por acción de la maquinaria de segregación el resto del material cromosómico se dirige a polos opuestos del huso mitótico. f) En la telofase la formación de nuevas membranas nucleares lleva a la formación de núcleos hijos,

cada uno con una copia del material genético completo a excepción de los fragmentos acéntricos rezagados, los cuales serán rodeados por su propia membrana, conduciendo a la formación de micronúcleos (núcleo de menor tamaño de color rosa). Figura de elaboración propia.

Parte de la susceptibilidad celular a la inducción de MN radioinducidos depende de su capacidad para reparar RSC y RDC de forma eficaz. Se ha observado que polimorfismos en algunos genes de sistemas de reparación de ADN (XRCC3, XRCC1, XPD) han mostrado contribuir en la susceptibilidad genética en individuos ocupacionalmente expuestos a bajas dosis de radiación llevando a un incremento en la frecuencia de MN con respecto a grupos no expuestos (Angelini et al., 2005; Cho et al., 2009).

La interacción de las RI con el ADN y el acceso de las especies reactivas del oxígeno a los posibles sitios de daño está determinada por la geometría de la molécula de ADN, la compactación de la cromatina, la posición relativa de los nucleosomas entre sí y la asociación del ADN a las histonas. Sitios con menor complejidad en su estructura organizacional presentan un mayor número de daños radioinducidos debido a que el ADN se encuentra más expuesto. Además del arreglo estructural de la cromatina, la transferencia lineal de energía (LET) de la RI (LET, cantidad de energía depositada por la RI unidad de distancia), determina el patrón de distribución espacial de las rupturas radioinducidas. RI con bajo LET (rayos X, rayos gama, partículas beta) inducen menor concentración de eventos de ionización y por lo tanto lesiones del ADN de menor complejidad que RI con alto LET (partículas alfa, protones) (Lavelle & Foray, 2014). Schipler y Iliakis (2013) proponen una clasificación de las lesiones de ADN, incluyendo las producidas por RI, según una escala de complejidad. Con respecto al daño radioinducido de menor a mayor complejidad encontramos:

1. RDC que incluyen modificaciones de sus extremos, frecuentemente un azúcar-fosfato dañado en forma de fosfoglicolato-3' y un extremo OH-5',
2. Agrupaciones ("*clusters*") de RDC y otros tipos de daños como modificaciones o

pérdidas de bases,

3. Agrupaciones ("*clusters*") de bases dañadas que derivan en RDC por actividad enzimática,
4. Agrupaciones ("*clusters*") de múltiples RDC en concentración suficiente como para desestabilizar la cromatina (cromotripsis).

2.6.2. Cromotripsis.

La fragmentación y reorganización aleatoria de cromosomas producto de un evento catastrófico es conocida como cromotripsis.

Los mecanismos asociados con la ocurrencia de la cromotripsis no se encuentran completamente descritos; sin embargo, se ha propuesto que estímulos tales como las RI (principalmente de alta LET) o los radicales libres pueden inducir una fragmentación importante de los cromosomas cuando estos se encuentran en anafase (Antonin & Neumann, 2016) (Maher & Wilson, 2012) (Cannan & Pederson, 2016).

La cromotripsis es un fenómeno que puede tener dos alcances:

- a) Formación de MN: Los fragmentos pueden ser unidos aleatoriamente por mecanismos de reparación del ADN (posiblemente UENH) para la formación de un cromosoma sin centrómero o telómeros. Pueden existir fragmentos que no se unen entre sí quedando libres. Los cromosomas o fragmentos acéntricos producidos serían rodeados por una nueva envoltura nuclear dando en última instancia la formación de MN (Korbel & Campbell, 2013) (Ly & Cleveland, 2017) (MacKinnon & Campbell, 2013) (Morishita et al., 2016) .
- b) Reincorporación de los MN al núcleo principal: luego de formado el MN, el material genético micronuclear puede experimentar fragmentación y luego formar rearrreglos.

Luego de subsecuentes ciclos celulares existe la posibilidad de que los cromosomas o fragmentos cromosómicos dentro del MN sean incorporados en el núcleo principal de las células hijas durante la telofase, pudiendo generar luego mayor cantidad de rearreglos cromosómicos (C. Z. Zhang et al., 2015).

3. Justificación.

La radiación es energía que viaja a través del espacio o la materia. Los dos tipos de

radiación utilizados en imagenología diagnóstica son de tipo particular y electromagnética (Bushberg et al., 2012). Con respecto a las radiaciones electromagnéticas, los rayos X son ampliamente utilizados en medicina veterinaria.

Poco tiempo después del descubrimiento de la radiación por Wilhelm Röntgen (1896), la radiación empezó a ser utilizada en el área de la salud, desde entonces se han consolidado diversos métodos de diagnóstico por imagen y tratamiento con radiaciones, formando un crisol de opciones que facilitan el manejo clínico del paciente. La radiología veterinaria tuvo sus primeras aplicaciones poco después del descubrimiento de la radiación X, sin embargo, estaban dirigidas principalmente hacia su uso terapéutico (Schnelle, 1968).

Desde el descubrimiento de la radiactividad (1898) y uso incipiente, se inicia el reporte anecdótico de los efectos de la sobreexposición a las radiaciones. Henri Becquerel (descubridor de la radioactividad) se convirtió en el primer caso documentado de una reacción adversa a la radiación. Pierre Curie utilizó el radio intencionalmente para crear una úlcera en su antebrazo; en 1911 Jagic reporta la incidencia de leucemia en cinco trabajadores ocupacionalmente expuestos (Pollard & Gatti, 2009). En 1927 se observan, por primera vez, mutaciones inducidas por radiación en *Drosophilla* (Muller, 1930).

Se requirió de muchos años de estudios epidemiológicos y clínicos para lograr tener la suficiente evidencia que ligara la exposición a RI con un efecto negativo en la salud como distintos tipos de cáncer, síndromes y desórdenes no malignos e incluso la muerte. Las consecuencias a la salud por exposición a altas dosis (mayores a 0.15 Gy) se encuentran bien documentados; el caso más conocido de exposición accidental es el de Chernobyl, donde se registraron altas dosis en más de 200 trabajadores involucrados en la respuesta inicial a la emergencia, de ellos 28 murieron a los dos meses de la exposición inicial a causa de enfermedad por radiación. Muchas víctimas iniciales de las bombas nucleares de Hiroshima y

Nagasaki también fallecieron por efectos de la radiación (International Atomic Energy Agency, 2010). De 1980 al 2013 se tiene registro de 634 accidentes radiológicos, los que involucraron la sobreexposición de 2390 personas de las cuales 190 fallecieron (Coeytaux et al., 2015).

Actualmente el LNT es la teoría predominante para la estimación de efectos a altas dosis y la mayoría de entes regulatorios recomienda la aplicación de este modelo para la estructuración de protocolos de protección radiológica, a pesar de que no existe consenso con respecto a su aplicabilidad a bajas dosis (menores a 0.15 Gy) debido a la falta de evidencia científica que lo avale (Cardarelli & Ulsh, 2018).

La extensión del uso de las radiaciones en los ámbitos de la investigación básica y aplicada (principalmente a nivel clínico) hace palpable la importancia de impulsar la ejecución de investigaciones en nuestro país en referencia a los efectos biológicos de la radiación a bajas dosis, con el objetivo de la creación de conocimiento y el perfeccionamiento de técnicas que permitan optimizar los programas de prevención y manejo de accidentes radiológicos, ampliar el conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares de respuesta a la exposición a la radiación, evitar al máximo efectos adversos u otras consecuencias que puedan afectar la salud así como las posibles implicaciones en materia de salud ambiental que puede tener el uso de emisores y fuentes de RI.

En nuestro país, el uso diagnóstico de la radiación X en veterinarias es muy común, sobre todo en la realización de imágenes para la identificación de fracturas, ubicación de objetos extraños y en la realización de cirugía ortopédica. Un sondeo entre las clínicas veterinarias del área metropolitana evidencia que el personal veterinario, profesional y auxiliar, a menudo sujeta al animal durante la exposición a radiación X y que solamente en algunas clínicas se utiliza el dosímetro físico. Se desconoce por lo tanto el impacto que estas prácticas puedan tener en la salud del personal expuesto y el riesgo de desarrollar lesiones como eritema,

alopecia, eritropenia e incluso cáncer en el largo plazo.

Las normas de protección radiológica en medicina humana y veterinaria exigen el uso de dosímetros personales para el POE, generalmente estos dosímetros son de tecnología termoluminiscente (TLD) y son utilizados a la altura del tórax, aunque también existen de anillo. El análisis de los daños cromosómicos radioinducidos por ensayos citogenéticos es una herramienta sumamente valiosa en la estimación de la dosis en individuos expuestos a radiación en accidentes radiológicos y nucleares, o cuando existe una ausencia completa del uso de método de dosimetría personal física (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

En este sentido existen distintos tipos de marcadores que permiten el análisis de los efectos radioinducidos al ADN, la prueba de cromosomas dicéntricos realizada con linfocitos de la sangre es la técnica utilizada con mayor frecuencia. Sin embargo, existen otras técnicas para la evaluación de la genotoxicidad tales como el ensayo de análisis de translocaciones, el análisis con condensación prematura de cromosomas y la prueba de MNBC.

Las dosis de radiación involucradas en radiología diagnóstica, a excepción de procedimientos intervencionistas, son raramente suficientes como para asociarse con efectos determinísticos. Considerando que el umbral de dosis para algunos efectos determinísticos es de 2 Gy, a bajas dosis los riesgos radiológicos se circunscriben principalmente a efectos probabilísticos esencialmente de tipo somático (Huda, 2016). Como excepción a esta situación se debe mencionar la exposición prenatal accidental con umbrales de dosis de 0.3 Gy que produce discapacidad cognitiva en el feto (Giaccia et al., 2012).

El método de MN se ha establecido como alternativa al ensayo de conteo de cromosomas dicéntricos en el campo de la protección radiológica como un biomarcador de los efectos de la exposición a radiaciones.

La cantidad de MN inducidos por RI se encuentra correlacionado con la dosis y tipo de radiación a la que es expuesto el individuo (Vral et al., 2011). El MNBC es un método lo suficientemente sensible para estimar dosis en un rango entre los 0.3 y 5 Gy, aunque con modificaciones al método hacia un enfoque multiparamétrico es posible alcanzar un rango de 0.1 a 15 Gy (Rodrigues et al., 2014). Para estimaciones de dosis es necesario conocer la relación o curva dosis-respuesta, que asocia la frecuencia del biomarcador con una dosis de exposición (Suto et al., 2015b).

Los MN tienen una vida media de 342 días, por lo que este ensayo podría ser utilizado en la detección de daño cromosómico meses después de la exposición, sin embargo se ha observado que en pacientes de radioterapia a un año posterior a la finalización del tratamiento la frecuencia de MN decae en un 60% (Badie et al., 2016; Vral et al., 2011).

El MNBC puede ser usado en casos de exposición prolongada, reciente y aguda (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), además de ser funcional para aplicar en situaciones asociadas a irradiaciones parciales del cuerpo (Purnami et al., 2017) así como para irradiaciones de cuerpo entero (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

La dosimetría física de las RI es la técnica más confiable para el registro de las dosis del POE, sin embargo, su uso de forma incorrecta o exposiciones por debajo del límite de detección puede llevar a subvaloraciones. Por supuesto, el no uso de estos dispositivos por parte del personal, genera un completo desconocimiento de las dosis de exposición (Sari-Minodier et al., 2007). Considerando lo anterior, es útil y necesario el uso de biomarcadores de daño genético radioinducido, tal como el MNBC, que además pueden brindar información sobre los riesgos a largo plazo de la exposición a RI (Francesca Maffei et al., 2014).

El MNBC es una alternativa al ensayo de conteo de cromosomas dicéntricos en el campo de la radioprotección médica como biomarcador de los efectos de la exposición a RI, siendo

por lo tanto una herramienta valiosa en la estimación del riesgo radiológico en el POE ante bajas dosis de radiación (exposiciones menores de 20 mSv/año, límite de dosis para el POE de acuerdo a la recomendación internacional) (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016). Comparando distintos biomarcadores (prueba de aberraciones cromosómicas y la prueba de sensibilidad a la bleomicina), Dias et al., (2007) concluye que la prueba de MNBC es más sensible para analizar la respuesta celular a bajos niveles de radiación.

Parece ser que el personal en salud expuesto incluso a dosis bajas de radiación está sujeto a incrementos en la frecuencia de MN. Dentro del POE, aquel que labora en secciones de radiología o cardiología intervencionista se exponen más consistentemente que otros grupos (Thierens, Vral, Morthier, Aousalah, & De Ridder, 2000), en esta práctica se da el uso de equipos fluoroscópicos (típicos en angiografía y cirugía ortopédica), esta mayor exposición podría llevar a mayor daño cromosómico en comparación al uso de otros equipos emisores de radiaciones con fines médicos (tomografía computarizada, radioterapia, radiología convencional) (Dias et al., 2007; Sierra, 2011; Farideh Zakeri & Hirobe, 2010a).

El MNBC se ha propuesto como herramienta eficaz en evaluación de accidentes radiológicos a gran escala, siendo útil en la detección de exposiciones graves (≥ 1 Gy) que requieren de un tratamiento médico inmediato y oportuno. En este contexto, es posible utilizar la frecuencia de MN como herramienta complementaria a la evaluación clínica, en la estimación de dosis y categorización temprana de los individuos sobreexpuestos, permitiendo determinar el manejo médico más adecuado para cada caso (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

En estas situaciones, una respuesta rápida es esencial, en comparación con el ensayo de cromosomas dicéntricos, la técnica del MNBC es más sencilla y rápida, por lo que lo hace una opción viable en el triaje en accidentes de exposición masiva. Rawojć et al. (2015) sostienen

que no existe diferencia en los resultados producidos por distintos analistas entrenados, teniendo un impacto importante en los tiempos de respuesta.

Los sistemas de análisis automatizado son herramientas útiles frente al análisis manual de muestras (Willems et al., 2010). Incluso se ha considerado que el análisis automatizado puede llegar a ser superior a la microscopía manual en términos de velocidad y objetividad y comparable en reproducibilidad (Shibai-Ogata et al., 2014).

En Costa Rica, los únicos ejemplos hasta la fecha de la aplicación del ensayo de MN en el monitoreo del daño genético (no radioinducido) son la investigación de (Ramírez & Cuenca, 2001) quienes utilizaron el MNBC en linfocitos como biomarcador de daño al material genético por exposición laboral a plaguicidas y el de Castro, Ramírez, & Cuenca (2004) aplicaron el MN sin bloqueo de la citoquinesis en células del epitelio oral de trabajadoras del empaque del banano.

Actualmente, el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica (INISA) cuenta con la primer curva de calibración dosis-efecto para rayos gamma, utilizando el ensayo de cromosomas dicéntricos, esto gracias a un proyecto nacional de cooperación técnica con el OIEA y el apoyo de Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios (HSJD). Esto lo constituye en el primer Servicio de Dosimetría Biológica en el país y en Centroamérica, que permitirá la biodosimetría de personas expuestas a RI en casos de accidentes radiológicos, tratamientos médicos y en poblaciones ocupacionalmente expuestas. Para el 2021 se Servicio de Dosimetría proyecta elaborar nuevas curvas para rayos X utilizando el ensayo de MN y el de cromosomas dicéntricos para altas dosis de radiación.

A la fecha no existe ninguna publicación o estudio finalizado sobre la aplicación del MNBC en el biomonitoreo de exposición a RI. Esta propuesta por lo tanto es innovadora en el área de

la radiobiología, utilizando el MNBC como biomarcador de riesgo a la salud del personal veterinario por su exposición a rayos X.

La presente investigación pretende resolver la siguiente interrogante:

¿Existen diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos entre un grupo de personal veterinario expuesto a los rayos X y un grupo de personal veterinario no expuesto?

3.1. Objetivo General.

- Determinar la utilidad del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis como biomarcador de daño al ADN por exposición a radiaciones ionizantes mediante el establecimiento de la frecuencia de micronúcleos en muestras de linfocitos periféricos de personal expuesto y no expuesto a rayos X en clínicas veterinarias de San José durante los años 2017, 2018 y 2019.

3.2. Objetivos Específicos.

- Estandarizar el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis como método para la detección de daño radioinducido al ADN.
- Registrar la frecuencia de micronúcleos en los grupos de estudio.
- Comparar la frecuencia de micronúcleos en los grupos de estudio.
- Proponer oportunidades de capacitación para el personal en veterinaria en buenas prácticas de seguridad radiológica y efectos biológicos de las radiaciones.

4. Metodología.

La presente investigación se desarrolló dentro del marco del proyecto “742-B6-325: Estimación del riesgo radiológico del personal expuesto en clínicas veterinarias” a cargo de la

Licda. Luisa Valle Bourrouet como investigadora principal en el INISA (este proyecto contó con la aprobación del Comité Ético Científico según oficio VI-8866-2015).

4.1. Población de estudio

La investigación contó con la participación de 40 personas sanas, que forman parte del personal de clínicas veterinarias o negocios afines ubicados dentro del Valle Central. Estos 40 participantes se distribuyeron de la siguiente manera:

Grupo A: 10 hombres y 10 mujeres expuestos a RI (veterinarios, asistentes y técnicos).

Grupo B: 10 hombres y 10 mujeres no expuestos a RI (veterinarios, asistentes, técnicos, personal administrativo o aquel personal que laboraba dentro del ámbito de la clínica veterinaria pero no se exponía a RI).

El reclutamiento de los participantes se realizó mediante el contacto directo a los encargados de las clínicas veterinarias, así como mediante cooperación con el Colegio de Médicos Veterinarios de Costa Rica, en donde se brindó una charla a cargo del Lic. Andrés Chaves Campos sobre los detalles de la investigación y sobre los fundamentos de radiobiología y radioprotección, con el fin de motivar a personal en veterinaria de clínicas especializadas en la atención de especies menores (gatos, perros, conejos, aves de corral entre otros). Otros métodos de reclutamiento utilizados fueron el anuncio de la investigación en redes sociales y contacto por vía telefónica a clínicas veterinarias de especies menores.

Las variables de inclusión fueron:

1. Mayores de 18 años,
2. Ser parte del personal de clínicas veterinarias o negocios afines del Valle Central.

Las variables de exclusión fueron:

1. Haber padecido o padecer de cáncer en el momento de reclutamiento.

2. Haber recibido un examen radiológico como parte de un chequeo médico en el último año previo a la toma de muestra.

3. Ser fumador activo o haber dejado de fumar en un periodo menor a un año previo de la toma de la muestra.

Se buscó aparear los participantes de los grupos de estudio por edad aproximada, de tal forma que no existiesen diferencias entre las medias de edad para cada grupo.

Se utilizó un instrumento de recolección de datos (ver Anexo 1) que permitió el registro y control de variables personales, ocupacionales o de estilo de vida que pudieran afectar la frecuencia de MN (Dhawa & Bajpayee, 2013).

Las variables que se consideraron para este estudio son:

1) frecuencia de MNs,

2) exposición a RI considerada como:

a. variable dicotómica (sí o no) en los análisis univariados

b. el número de radiografías por día para los análisis multivariados, la cual dependiendo del grupo toma los siguientes valores:

i. grupo no expuesto el valor de esta variable es cero,

ii. grupo expuesto esta variable toma distintos valores dependiendo del nivel de exposición del participante,

3) años de exposición,

4) sexo (femenino o masculino),

5) edad; en años cumplidos,

6) sustancias químicas (en esta variable se incluye el uso de desinfectantes de uso veterinario, plaguicidas, desparasitantes, quimioterápicos y otras sustancias con potencial genotóxico), considerada como variable dicotómica (sí o no) en todos los

análisis (univariado y multivariado),

- 7) consumo de alcohol, considerada como variable dicotómica (sí o no) en todos los análisis.

Los participantes firmaron un consentimiento informado (ver Anexo 2), el cual dejaba plasmado las condiciones bajo las cuales se utilizó la información obtenida y la anuencia del sujeto de participar en la investigación.

4.2. Unidades de análisis

La unidad de análisis del presente estudio fueron las preparaciones celulares obtenidas mediante el ensayo de MNBC, de las cuales se registró la frecuencia de MN en 2000 células binucleadas.

4.3. Recolección de muestras, estandarización del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis y obtención de las preparaciones cromosómicas

La estandarización del ensayo inició en enero de 2017, tomando como base el protocolo estándar simple propuesto por el Organismo Internacional de Energía Atómica, (2014). Cuando se inició este proyecto y se implementó la técnica de MNBC, se tomaron fotografías de los MN de las primeras preparaciones, las imágenes obtenidas, en octubre del 2016 fueron sometidas a evaluación por parte de los pares internacionales: M.Sc. Jorge Ernesto González Mesa del laboratorio de Dosimetría Biológica del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones de Cuba (CPHR) y la Lic. Marina Di Giorgio del Laboratorio de Dosimetría Biológica de la Autoridad Regulatoria Nuclear de la República de Argentina (ARN). En el 2017, el personal técnico del Laboratorio de citogenética del INISA recibió capacitación en la técnica MNBC en el Laboratorio de Dosimetría Biológica de la ARN, Argentina, permitiendo adquirir mayores

destrezas para el análisis de MN.

El periodo de recolección de muestras inició en febrero 2017 y se extendió hasta agosto del 2019. A continuación, se describe el protocolo que fue utilizado para el procesamiento de estas:

Se recolectó una muestra de 5 ml de sangre periférica de cada uno de los participantes en un tubo Vacutainer heparinizado. Para cada una de las muestras, se realizaron dos cultivos separados, de tal forma que se agregaron 0,5 mL de sangre entera a dos tubos cónicos de 15 mL con 4,5 mL de medio de cultivo (PB-MAX). Se cultivaron a 37°C, en una incubadora de CO₂ en atmósfera humidificada. A las 24 horas se agregaron al cultivo 20 µL de citocalasina B (Cyt-B) a una concentración de 1,5 mg/mL (para una concentración en volumen final de 6 µg/mL).

Dado que la Cyt-B se disuelve mal en una solución acuosa, se preparó una solución madre de Cyt-B en dimetilsulfóxido (5 mg Cyt-B en 3,3 mL de DMSO), y luego fue separada en fracciones y conservada a -20 °C hasta su uso.

A las 72 horas de iniciado el cultivo celular, se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se sometieron las células a tratamiento hipotónico con 7 mL de KCl 0,075mol/L frío (4 °C) para lisar los eritrocitos y se centrifugaron inmediatamente a 1200 rpm durante 10 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, que se sustituyó por 5 mL de fijador (metanol: ácido acético (10:1) recién diluido 1:1 con solución de Ringer (4,5 g NaCl, 0,21g KCl, 0,12 g CaCl₂ en 500 mL H₂O)). Se agregó el fijador agitando las células para impedir que se formen grumos. Seguidamente, se centrifugaron las células de nuevo a 1200 rpm durante 10 min.

Las células se lavaron dos o tres veces con fijador recién preparado sin solución de Ringer, se renovó el fijador cada vez, hasta que la suspensión de células se aclaró. Seguidamente, se retiró el sobrenadante hasta 1 cm o menos por encima del botón celular (en función del tamaño

del botón), se resuspendieron las células delicadamente, y se vertió la suspensión gota a gota sobre portaobjetos limpios, los cuales se dejaron secar al aire.

Para análisis al microscopio óptico, las células se tiñeron en Giemsa al 2–6 % (1 mL Giemsa Steim en 40 mL de GURR Gibco a un pH de 6.8) durante 10 minutos a oscuras, seguido de un rápido aclarado en agua destilada y secado al aire.

4.4. Análisis microscópico de las preparaciones obtenidas mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis.

El análisis microscópico de las preparaciones cromosómicas se realizó a un aumento de 40x, se verificaron las características de las células binucleadas que aparentaban presentar un micronúcleo a un aumento de 100x. Se contaron 2000 células binucleadas de las preparaciones obtenidas de cada participante, 1000 de cada uno de los dos cultivos.

Parte de la estandarización del proceso, requirió el establecimiento de criterios unificados para que los analistas del Laboratorio de Dosimetría Biológica pudieran incluir o descartar células binucleadas con o sin MN dentro del registro. Para la presente investigación el análisis fue realizado por una sola persona, la Bach. Alejandra Vargas.

El Proyecto Colaborativo Internacional en la Frecuencia de MN en Poblaciones Humanas (Proyecto HUMN) ha publicado numerosas investigaciones sobre las aplicaciones de este ensayo en el análisis de distintas problemáticas de la salud humana y ha brindado una descripción detallada sobre los criterios para el conteo y registro de células binucleadas en linfocitos de sangre periférica, y que fueron utilizados en la presente investigación (Fenech et al., 2003):

1. Las células deben ser binucleadas.
2. Los dos núcleos en una célula binucleada deben presentar membranas nucleares

intactas y deben estar situadas dentro de los mismos límites citoplasmáticos.

3. Los dos núcleos en una célula binucleada deben ser aproximadamente similares en tamaño.
4. Los dos núcleos dentro de una célula binucleada pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico que no es más ancho que un cuarto del mayor diámetro nuclear.
5. Los dos núcleos en una célula binucleada pueden tocarse entre sí, sin embargo lo ideal es que no exista traslape entre ellos. Una célula con traslape de los núcleos puede contarse solo si los límites nucleares son distinguibles entre sí.
6. Los límites citoplasmáticos (membrana celular) de una célula binucleada deben estar intactos y claramente distinguible de los límites de otras células

Con respecto a las células binucleadas con MN se tomaron en cuenta los siguientes criterios (Fenech et al., 2003):

1. El diámetro varía entre $1/16$ y $1/3$ del diámetro de uno de los núcleos principales.
2. Son redondos u ovalados.
3. No son refráctiles, por lo que pueden ser diferenciados de otros artificios tales como partículas de tinción.
4. No están unidos o conectados con los núcleos principales.
5. Pueden tocarse pero no traslaparse con los núcleos principales. Los límites del MN deben distinguirse de los límites del núcleo.
6. Usualmente tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, en algunas ocasiones pueden teñirse con mayor intensidad (fig. 4).

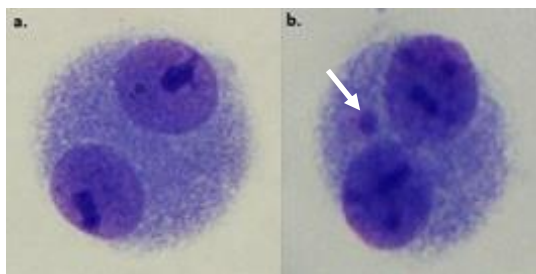


Figura 4. Ejemplos de células binucleadas, a. Célula binucleada sin presencia de micronúcleos. b. Célula binucleada con presencia de un micronúcleo (señalado con una flecha blanca) (100x, INISA 2018).

Las células binucleadas que presentaron MN fueron registradas utilizando un sistema de calificación, aquellas que cumplan con todos los criterios anteriormente mencionados fueron consideradas como de grado 1, aquellas que no cumplieron con un criterio se consideraron de grado 2, y las que no cumplían con 2 criterios o más fueron clasificados de grado 3.

Las células inicialmente clasificadas como de grado dos y tres fueron evaluadas nuevamente en conjunto con otros analistas del laboratorio, Licda. Luisa Valle y Lic. Andrés Chaves, quienes en consenso recalificaron la célula como grado 1 (célula micronucleada verdadera) o la descartaron del conteo.

4.5. Análisis estadístico.

La información recopilada fue tabulada en bases de datos para luego ser presentada en tablas de frecuencias. Todo análisis estadístico presentado en esta investigación se realizó mediante el software IBM SPSS Statistics versión 22.0.

Se hizo una estadística descriptiva de la muestra en estudio. Para comparar las medias de la variable edad entre los grupos expuesto y no expuesto, se utilizó la prueba U de Mann Whitney. Para conocer si existían diferencias con respecto al consumo de alcohol y a la exposición ocupacional a sustancias químicas, se utilizó la prueba de chi cuadrado de Pearson.

En relación con la frecuencia de MN inicialmente se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de prueba de Levene. Debido a que la frecuencia de MN en el grupo no expuesto no presenta una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica, lo que permitió realizar comparaciones de las medias de frecuencia de MN entre los grupos control y expuesto (dos muestras independientes) mediante la prueba paramétrica de t-student (Banerjee et al., 2016).

Para conocer la influencia de las variables en estudio sobre la frecuencia de MN, se realizaron distintos modelos de regresión lineal múltiple. Los modelos finales propuestos son para la muestra general, así como para cada grupo de estudio (expuesto y no expuesto). Para llegar a estos modelos, inicialmente se realizaron regresiones lineales múltiples preliminares (ver anexos), que incluían todas las variables recopiladas en el estudio. Los modelos fueron evaluados en base al factor de inflación de la varianza (VIF, por sus siglas en inglés) para encontrar posible colinealidad entre las variables predictoras. En base al valor del VIF y en función de la variable que tuviese un mayor significado biológico, se escogió las variables que iban a incluirse en los modelos finales. Posteriormente se efectuó otra modelización de las regresiones; se compararon los R^2 ajustados de los modelos realizados y se seleccionaron como modelos finales los que presentan el mayor valor de R^2 ajustado.

4.6. Alcances del diseño propuesto

4.6.1. Validez interna

Antes de iniciar la recolección de muestras, se realizó una prueba del ensayo de MN para asegurar la obtención de preparaciones adecuadas que cuenten con células binucleadas para su análisis.

Los datos obtenidos mediante la consulta directa al participante y registrados en el instrumento de recolección 1, así como los datos obtenidos mediante el análisis de las preparaciones cromosómicas, permanecieron dentro del marco de la confidencialidad de la información del participante, de manera que durante la presentación de datos no se incluyeron los datos personales del individuo. Como medio de seguridad se identificaron los datos con un sistema de codificación, de forma que no es posible relacionarlos directamente con la identidad del participante, sin embargo, es posible el acceso a los datos sin procesar por parte de la investigadora principal (hojas de recolección de datos) si fuese necesario corroborar las observaciones.

Con el fin de minimizar el sesgo del observador y que sus expectativas influyan sobre el resultado observado, la fase de análisis se realizó bajo la técnica de enmascaramiento de ciego simple, de tal manera que el analista, ignora el grupo al que pertenecen las preparaciones que analizó.

4.6.2. Validez externa

La presente investigación (innovadora en nuestro país en el uso del MNBC como marcador radiobiológico) tuvo un impacto indirecto sobre la salud del personal veterinario que utiliza equipos emisores de RI en temas de radiobiología y protección radiológica. Asimismo, el conocimiento y caracterización de los efectos radioinducidos en la salud tiene relevancia en los procesos en los que se utilicen RI (tanto en medicina humana y animal, así como en la industria), por estas razones esta investigación se perfila dentro de la imagen de la UCR como una imagen de universidad vanguardista y preocupada por la salud de la población.

5. Resultados.

5.1. Capacitación de participantes

Previo al inicio del reclutamiento de los participantes en el estudio, el miércoles 16 de noviembre del 2016 se realizó exitosamente una actividad de capacitación, en la que participé impartiendo los temas de efectos biológicos de las RI y de protección radiológica (principios de tiempo de exposición, distancia de la fuente y blindaje de fuentes; fundamentos de optimización, justificación y límite de dosis, unidades de medición de las radiaciones, dosimetría de las radiaciones). Esta actividad se llevó a cabo en colaboración con el Colegio de Médicos Veterinarios de Costa Rica, se contó con la asistencia de aproximadamente 20 participantes.

Como parte de los objetivos de investigación y para el fomento de la capacitación del personal veterinario, se realizó una propuesta programática para un curso de protección radiológica con énfasis al personal en veterinaria. Los contenidos fueron seleccionados en base a los requisitos del Ministerio de Salud para obtener la licencia de operador de equipos emisores de radiaciones ionizantes junto con contenido desarrollado en base a la presente investigación (ver anexos).

5.2. Estandarización del ensayo.

El análisis de calidad por imágenes realizado por los pares internacionales, arrojaron que las preparaciones celulares para análisis microscópico fueron de excelente calidad, siendo que la evaluación obtuvo valores superiores al límite mínimo de aceptación de -2,27 (ver Anexo 3).

5.3. Caracterización de la muestra: variables ocupacionales, personales y de estilo de vida.

Las clínicas veterinarias y negocios afines donde laboraban los participantes en el estudio

se especializaban en la atención de especies menores. La distribución de la muestra con respecto a la profesión o cargo ocupado se muestra en el cuadro 3, en el rubro de “otros” se incluyen profesiones como peluquero veterinario, chofer de transporte de animales para la clínica o dependiente de farmacia veterinaria.

Cuadro 3. Distribución de la muestra según profesión o cargo ocupado en la clínica veterinaria o negocio afín (n=40)

Profesión o cargo	Cantidad (n=40)	Expuesto	No expuesto
Profesional en veterinaria	13 (32,5%)	11 (27,5%)	2 (5%)
Asistente en veterinaria	11 (27,5%)	6 (15%)	5 (12,5%)
Profesional en imagenología	1 (2,5%)	1 (2,5%)	0 (0%)
Personal administrativo	6 (15%)	1 (2,5%)	5 (12,5%)
Otros	6 (15%)	1 (2,5%)	5 (12,5%)
No indica	3 (7,5%)	0 (0%)	3 (7,5%)
Total	40 (100%)	20 (50%)	20 (50%)

Los procedimientos radiológicos, se ejecutaban en recintos cerrados y de acceso controlado. El personal veterinario en estudio se encontraba expuesto solamente a rayos X, eminentemente a través del uso de equipos de radiografía convencional; solo en una de las clínicas donde laboraban los participantes se contaba con un equipo de tomografía computarizada (que también es un emisor de rayos X).

En cuanto la edad de los participantes, el rango de edades entre los grupos expuesto y no expuesto se aproximan a los 31 años, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre sus valores respectivos ($p=0,892$) (cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de la muestra según edad en años cumplidos (n=40)

Grupo de estudio	$\bar{x} \pm DE$	R	Valor de p
Expuesto			
Hombres (n=10)	33,8 \pm 12, 8	20-59	

Mujeres (n=10)	27,8±7,1	20-45	0,892
Total (n=20)	30,8±10,5	20-59	
No expuesto			
Hombres (n=10)	37,0±12,9	20-58	
Mujeres (n=10)	26,7±7,9	19-49	
Total (n=20)	31,9±11,7	19-58	

̄x: promedio. DE: desviación estándar. R: rango

Se hizo consulta sobre el hábito y frecuencia del consumo de alcohol de los participantes. Sobre la distribución de esta variable, el 95% de los participantes indicó tener un consumo bajo o no consumir del todo (cuadro 5). El valor de p para la prueba de Chi-Cuadrado de Pearson indica que no existen diferencias entre el consumo de alcohol en los grupos de estudio ($p=0,056$).

Cuadro 5. Distribución de la muestra según consumo de alcohol (n=40)

Consumo de alcohol	Exposición a RI		Total (%)	Valor de p
	Sí	No		
No consume	0	5	5 (12,5)	0,056
Menos de 5 tragos a la semana	19	14	33 (82,5)	
5- 10 tragos a la semana	0	0	0 (0)	
Mas de 10 tragos a la semana	1	1	2 (5)	

Se consultó a los participantes sobre el uso de sustancias químicas durante sus labores, algunos de los productos mencionados en el cuestionario fueron el formaldehído, el glifosato, el Gramoxone (dicloruro de de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), el fipronil y la cipermetrina. Tal como se muestra en el cuadro 6, la variable exposición a sustancias químicas se distribuye de manera similar entre los grupos de estudio ($p=0,337$).

Cuadro 6. Distribución del grupo en estudio según exposición a sustancias químicas (n=40)

Exposición a sustancias químicas	Exposición a RI		Total (%)	Valor de p
	Sí	No		
Sí	10	7	17 (42,5%)	0,337
No	10	13	23 (57,5%)	

Dentro del grupo de individuos expuestos a RI, se deben considerar los años de exposición ocupacional ($6,6 \pm 6,5$ años, Rango (R): 1,5-29 años), la cantidad aproximada de radiografías realizadas por día ($10,3 \pm 5,3$ radiografías/día, R: 4-25 radiografías/día) y las medidas de protección que utilizan las personas expuestas a RI (cuadro 7). En el grupo expuesto a RI, 12 participantes (60%) laboran con radiaciones hace menos de 5 años, 6 participantes (30%) tienen trabajando con radiaciones entre 5 y 10 años, mientras que solo 2 participantes (10%) tienen más de 10 años laborando (15 y 29 años). Con respecto a la cantidad de radiografías realizadas al día por el POE, un 40% del POE (8 participantes) realizan menos de 10 radiografías al día, un 50% (10 participantes) realiza entre 10 y 15 radiografías y solo un 10% (2 participantes) realiza más de 15 radiografías al día.

Cuadro 7. Características ocupacionales del grupo expuesto a radiaciones ionizantes (n=20)

Característica	Si	No	NR*
Uso de dosímetro	6 (30%)	14 (70%)	0
Uso de indumentaria de protección	20 (100%)	0	0
¿Ha recibido capacitación en protección radiológica?	8 (40%)	12 (60%)	0
¿Está interesado en recibir capacitación en protección radiológica?	19 (95%)	0	1 (5%)

\bar{x} : promedio. DE: desviación estándar. R: rango

*NR: No responde

5.4. Pruebas de normalidad de los datos de frecuencia de MN

La frecuencia de MN del grupo expuesto presentó una distribución normal, mientras que en el grupo no expuesto la frecuencia de MN no tiene una distribución normal. En el cuadro 8 se muestran los resultados de las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para las frecuencias de MN, antes y después de aplicar una transformación logarítmica.

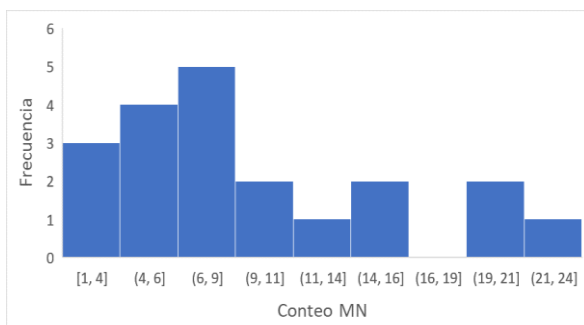
Cuadro 8. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para la frecuencia de MN en los grupos estudiados (sin y con transformación logarítmica)

Medida estadística	Frecuencia de MN		Transformación log10 de frecuencia de MN	
	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto
Promedio	9,5	7,5	0,95	0,80
Desviación estándar	6,1	6,5	0,27	0,38
Valor de p	0,095*	0,018	0,793*	0,333*

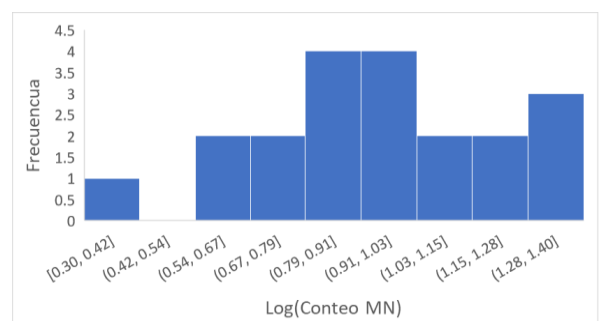
* $p > 0.05$ (no se rechaza la hipótesis nula (H_0), por lo que podemos afirmar que los datos se distribuyen de forma normal).

En los gráficos 1 y 2 se aprecia la distribución de los datos de los grupos de estudio, antes y después de aplicar la transformación logarítmica.

Gráfico 1. Histogramas de frecuencia de MN para el grupo expuesto (sin y con transformación logarítmica)

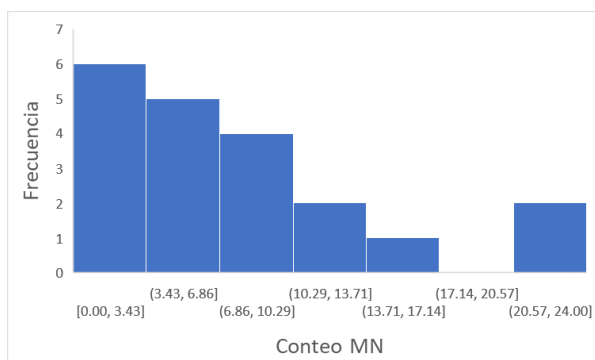


B. Histograma sin transformación logarítmica

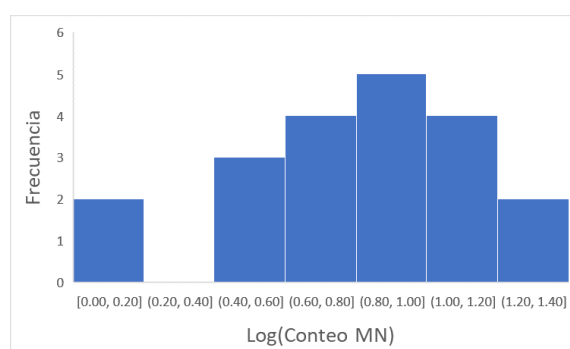


A. Histograma con transformación logarítmica

Gráfico 2. Histogramas de frecuencia de MN para el grupo no expuesto (sin y con transformación logarítmica)



A. Histograma sin transformación logarítmica



B. Histograma con transformación logarítmica

5.5. Frecuencia de MN en la muestra estudiada.

En el cuadro 9 se indican los promedios de las frecuencias de MN observadas en los grupos de estudio en la presente investigación, luego de haber realizado la transformación logarítmica. Independientemente del sexo, los promedios de las frecuencias de MN son ligeramente mayores en los grupos de personal expuesto con respecto a los no expuestos, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Cuadro 9. Frecuencia de MN por cada 2000 células binucleadas expresada en log10 para los expuesto y no expuesto (n=40)

Sexo	Grupo expuesto			Grupo no expuesto			valor de p
	N	$\bar{X} \pm DE$	R	N	$\bar{X} \pm DE$	R	
Mujeres	10	1,01 \pm 0,24	0,602-1,398	10	0,90 \pm 0,17	0,602-1,176	0,278
Hombres	10	0,89 \pm 0,30	0,301-1,301	10	0,69 \pm 0,50	0-1,398	0,298
Total	20	0,95 \pm 0,27	0,301-1,398	20	0,80 \pm 0,38	0-1,398	0,157

\bar{X} : promedio. DE: desviación estándar, R: rango

Sin considerar la variable de exposición a RI y agrupando la muestra en base a su sexo, las mujeres tienden a mostrar promedios de frecuencias de MN expresadas en log10 ligeramente superiores a los hombres, sin que estos valores sean estadísticamente significativos (cuadro 10).

Cuadro 10. Frecuencias de MN por cada 2000 células binucleadas (expresadas en log10) según el sexo del participante (n=40)

Sexo	n	$\bar{x} \pm DE$	R	Valor de p
Mujeres	20	0.95 \pm 0.21	0,602-1,398	0,117
Hombres	20	0.79 \pm 0.42	0-1,398	

\bar{x} : promedio. DE: desviación estándar. R: rango

5.6. Regresión lineal múltiple de las variables de estudio.

Se escogieron como modelos finales, aquellos que tienen un mayor R^2 ajustado. En los cuadros 11 y 12 se muestran los detalles para el modelo de regresión lineal múltiple seleccionado para la muestra total.

El modelo propuesto para la muestra total es estadísticamente significativo, las variables edad en años cumplidos, sexo y exposición a RI, explican alrededor de un 33% de la variabilidad de la frecuencia de MN expresadas en log10 (cuadro 11).

Cuadro 11. Resumen del modelo de regresión lineal para la muestra total (n=40)

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	valor de p
0,617	0,381	0,329	0,275	0,001

En base a los coeficientes β para cada uno de los parámetros del modelo, se deduce que (cuadro 12):

- La edad es la variable con mayor importancia relativa, seguido del sexo del participante y por último la cantidad de radiografías tomadas por día.
- Conforme aumenta la edad de los participantes aumenta la frecuencia de MN: por cada año de vida, aumenta en 0,017 la frecuencia de MN.
- La frecuencia de MN es menor en hombres que en mujeres: una participante mujer tendrá 0,355 más de frecuencia de MN, en comparación a un participante hombre.
- Conforme aumenta la cantidad de radiografías tomadas por día aumenta la frecuencia de MN: un aumento de una unidad en la cantidad de radiografías realizadas por día lleva a un aumento de 0,017 en la frecuencia de MN.

Ninguna de las variables incluidas en el modelo muestra colinealidad entre sí ($VIF < 10$).

Cuadro 12. Variables seleccionadas en el modelo de regresión lineal para la muestra total (n=40)

Variables	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados Beta	t	valor de p	Intervalo de confianza (95%)		VIF
	B	Error estándar				Límite inferior	Límite superior	
Constante	0,792	0,161	-	4,913	0,000	0,465	1,118	-
Radiografías/día	0,017	0,007	0,347	2,543	0,015	0,003	0,030	1,080
Sexo	-0,355	0,097	-0,536	-3,650	0,001	-0,552	-0,158	1,255
Edad	0,017	0,004	0,543	3,794	0,001	0,008	0,025	1,190

El resumen del modelo de regresión lineal múltiple para el grupo expuesto se encuentra en los cuadros 13 y 14. En este caso el modelo propuesto (cuadro 13) es significativo y las variables que se incluyeron en conjunto explican el 45% de la variabilidad de la frecuencia de MN.

Cuadro 13. Resumen del modelo de regresión lineal múltiple para el grupo expuesto a radiaciones ionizantes (n=20)

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	valor de p
0,733	0,537	0,45	0,202	0,005

El sexo y la edad del participante influyen de forma significativa en la frecuencia de MN del grupo expuesto. Sin embargo, el parámetro de cantidad de radiografías está por encima del valor de significancia estadística.

Al igual que en el modelo global, los coeficientes β para cada uno de los parámetros del modelo del grupo expuesto (cuadro 14), indican que:

- a) La edad es la variable con mayor importancia relativa, seguido del sexo del participante
- b) Conforme aumenta la edad aumenta la frecuencia de MN: un aumento de una unidad en la edad lleva a un aumento de 0,019 en la frecuencia de MN.
- e. La frecuencia de MN es menor en hombres que en mujeres: una participante mujer tendrá 0,357 más de frecuencia de MN, en comparación a un participante hombre.

Ninguna de las variables incluidas en el modelo muestra colinealidad entre sí ($VIF < 10$).

Cuadro 14. Variables seleccionadas en el modelo de regresión lineal para el grupo expuesto a radiaciones ionizantes (n=20)

Variables	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	valor de p	Intervalo de confianza (95%)		VIF
	B	Error estándar	Beta			Límite inferior	Límite superior	
Constante	0,690	0,179	-	3,857	0,001	0,311	1,069	-
Radio-grafías/día	0,020	0,010	0,427	2,027	0,060	-0,001	0,041	1,529
Sexo	-0,357	0,117	-0,673	-3,059	0,007	-0,605	-0,110	1,672
Edad	0,019	0,005	0,717	3,926	0,001	0,009	0,029	1.153

En los cuadros 15 y 16 se muestra lo correspondiente al modelo de regresión lineal múltiple para el grupo no expuesto. El modelo propuesto para el grupo no expuesto no fue significativo (cuadro 15), por lo que las variables incluidas en el modelo no explican la frecuencia de MN observadas en este grupo (cuadro 16).

Cuadro 15. Resumen del modelo de regresión lineal múltiple para el grupo no expuesto a radiaciones ionizantes (n=20)

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	valor de p
0,508	0,258	0,171	0,346	0,079

Cuadro 16. Variables seleccionadas en el modelo de regresión lineal para el grupo no expuesto a radiaciones ionizantes (n=20).

Variables	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	valor de p	Intervalo de confianza para B		VIF
	B	Error estándar	Beta			Límite inferior	Límite superior	
Constante	0.866	0.275	-	3.153	0.006	0,287	1,446	-
Sexo	-0.371	0.174	-0.501	-2.138	0.047	-0,737	-0,05	1.258
Edad	0.015	0.008	0.469	1.999	0.062	-0,01	-0,031	1.258

6. Discusión

6.1. Análisis de variables ocupacionales de los participantes.

La medicina veterinaria involucra el manejo de animales de múltiples especies, lo que conlleva a que la radiología veterinaria contemple escenarios de diversa índole, siendo muy distintas las condiciones en que se realiza un procedimiento radiológico sobre animales de especies mayores al procedimiento en especies menores. La radiología de especies mayores, por ejemplo, un caballo, puede presentar ciertas dificultades, como que la adquisición de las imágenes deba realizarse en ambientes no controlados que carezcan de la infraestructura necesaria para asegurar la calidad del procedimiento y la protección del personal expuesto. En el caso de especies menores, debería de contarse con una sala de procedimientos con equipo instalado y blindajes adecuados que permitan minimizar la exposición ocupacional (Camacho, 2017).

Si bien, la adquisición de imágenes diagnósticas que involucren el uso de RI, es una práctica común en la veterinaria, la aplicación integral de la protección radiológica (uso correcto del dosímetro, indumentaria plomada, capacitación continua, etc.) es limitada en la muestra en estudio. En primera instancia podemos mencionar, la ausencia del uso de dosímetros personales en la mayor parte del POE de la muestra estudiada. Es importante mencionar, que la dosimetría física personal por tecnología termoluminiscente (TLD) es el método más utilizado para el cálculo o estimación de dosis equivalente personal recibida por exposición ocupacional a RI (International Atomic Energy Agency, 2018). Su uso por parte del POE es obligatorio a nivel nacional según el Reglamento Sobre Protección Contra las RI, lo que incluye al POE de aquellas instalaciones de medicina veterinaria que utilicen equipos emisores de RI (Decreto Ejecutivo 24037- S, 1994). Las razones por las cuales parte del POE de la muestra

no utiliza la dosimetría personal no fueron documentadas en el presente trabajo y podrían ser objeto de futuras investigaciones, sin embargo, múltiples autores han expresado la importancia que el POE en veterinaria porte este método de monitoreo (Hernández-Ruiz et al., 2012; Hupe & Ankerhold, 2011). Como consecuencia de la falta de uso de dosímetros personales, parte del POE de la muestra no conoce la dosis de radiación que recibe como consecuencia de su práctica laboral.

Junto con la ausencia de dosimetría personal, otro aspecto ocupacional relevante es la falta de capacitación por parte del POE en el área de la protección radiológica. En nuestro país, según la legislación vigente, para la operación de equipos emisores de RI es necesario la obtención de una licencia por parte del Ministerio de Salud. Parte de los requisitos solicitados para lograr dicha licencia es *“Haber realizado un curso básico sobre protección radiológica, cuyo programa esté previamente aprobado por la autoridad competente”*, siendo el Ministerio de Salud de Costa Rica el ente que aprueba y regula estos cursos (*Decreto Ejecutivo 24037-S, Reglamento Sobre Protección Contrás Las Radiaciones Ionizantes*, 1994). No se documentó la razón por la que parte del POE no contaba con capacitación en radioprotección, aunque con certeza se conoce que no es por despreocupación, pues la mayoría del grupo expuesto expresó interés en ser instruidos en esta área (a excepción de un participante que dejó esta pregunta en blanco). Esto demuestra la conciencia del POE sobre la relevancia de la protección radiológica en su quehacer profesional, de igual forma es importante rescatar el uso regular de indumentaria plomada de protección, la cual todo el POE reportó utilizar durante la realización de radiografías.

6.2. Análisis de las frecuencias de MN.

La media de las frecuencias de MN en la población en estudio se comporta de varias

maneras. Este comportamiento en la frecuencia de MN en los grupos estudiados podría explicarse por distintas razones:

1. Tipo de análisis realizado:

- 1.1. Análisis univariado

- 1.2. Análisis multivariado

- 1.2.1. Edad del participante.

- 1.2.2. Sexo del participante.

- 1.2.3. Exposición a RI

- 1.2.3.1. Relación entre los mecanismos celulares de respuesta ante el daño radioinducido y la frecuencia de MN observada en estudios de biomonitordeo.

2. Limitaciones del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis.

3. Variables no incluidas en los modelos finales de regresión lineal múltiple.

A continuación, se realizará un análisis de la influencia de estas situaciones sobre el resultado observado, a manera de entender de forma más amplia la formación de MN radioinducidos a la luz de investigaciones actuales del campo.

6.2.1. Análisis univariado

En base a los resultados de comparación de medias, se obtiene que las frecuencias de MN en la población expuesta son ligeramente mayores que en la población no expuesta, sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas. Segregando los grupos en estudio basados en su sexo, se registró una mayor frecuencia de MN en mujeres, sin que la diferencia con respecto al grupo de hombres fuese de significancia estadística. Este comportamiento en la frecuencia de MN en los grupos estudiados podría explicarse por limitaciones propias del análisis univariado como:

1. Efecto del tamaño de la muestra sobre el poder estadístico del análisis univariado.
2. Efecto de variables no consideradas en el análisis univariado.
3. Considerar la variable exposición a RI como dicotómica sin tomar en cuenta la exposición gradual a RI en base a la cantidad aproximada de radiografías realizadas por día.

Estudios similares, generalmente tienden a tener tamaños de muestra superiores a los utilizados en el presente estudio (Sari-Minodier et al., 2007; Sierra, 2011; Zakeri & Hirobe, 2010). Aunque no se tienen datos específicos, se considera que la población de personal veterinario expuesto a RI del área metropolitana parece ser de tamaño reducido, limitando la disponibilidad de sujetos con interés de participar en la investigación. Esta limitación podría explicar las no diferencias de la frecuencia de MN entre hombres y mujeres, a pesar de que la distinta frecuencia basada en sexo se encuentra ampliamente documentada (Fenech & Bonassi, 2011; Jones et al., 2012; Nefic & Handzic, 2013; Sommer et al., 2020)

Por otro lado, debido a la naturaleza del análisis univariado, se valoran individualmente las variables, de manera que se desconoce el efecto de múltiples variables sobre la frecuencia de MN.

Diversos estudios muestran que la variación de la frecuencia de MN es dependiente de la dosis de RI a la que un individuo es expuesto, consistente con el hecho de que la cantidad de RDC aumenta con la dosis de RI (Baeyens et al., 2011; Kang et al., 2016; Pajic et al., 2014; Rastkhah et al., 2016; Ryu et al., 2016). El análisis univariado realizado, no consideró el efecto gradual de la dosis de exposición ocupacional, al contrario, se utilizó una categoría dicotómica para segregar la muestra y comparar los valores promedios en la frecuencia de MN. Esta limitación para poder evaluar el efecto proporcional de la dosis sobre la frecuencia de MN podría explicar los resultados obtenidos mediante este análisis estadístico.

Por estas razones, también se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, que considera el efecto gradual del nivel de exposición a RI sobre la frecuencia de MN así como el efecto de otras variables.

6.2.2. Análisis multivariado.

Está documentado que la exposición a RI puede asociarse con un aumento en la frecuencia de MN con respecto a su valor basal; sin embargo, variables como la edad, el sexo, los factores de estilo de vida (consumo de alcohol y tabaquismo) u ocupacionales (exposición a sustancias químicas) también generan variabilidad en la frecuencia basal de estos (Fenech & Bonassi, 2011).

En la presente investigación al menos un tercio ($R^2 = 0,329$) de la variabilidad de la frecuencia de MN de la muestra general pueden explicarse mediante la influencia conjunta de la edad, el sexo y el nivel de exposición ocupacional a RI, lo cual concuerda con lo informado en la literatura. Sari-Minodier et al. (2007) observaron una influencia del sexo, la edad y el nivel de exposición a RI sobre la frecuencia de MN, siendo el sexo femenino y la mayor edad los factores con más impacto en la frecuencia de MN de POE de distintas especialidades (medicina nuclear, radiología, hemodinamia, intervencionismo). Siama et al. (2019) registraron influencia tanto de la edad como de la cantidad de pacientes atendidos por día en la frecuencia de MN de personal de imagenología de servicios de rayos X. Terzic et al. (2015) encontraron que en un grupo de 56 trabajadores de medicina nuclear, los profesionales en imagenología de sexo femenino, con mayor edad, con mayores dosis de exposición anuales y mayor número de años de exposición ocupacional, tienen a presentar mayor frecuencia de MN. Qian et al. (2016) registraron un aumento significativo en la frecuencia de MN del POE que labora a nivel hospitalario con respecto a personal no expuesto, al igual que una asociación positiva entre la

frecuencia de MN y la dosis acumulada de exposición a RI.

En el caso del grupo expuesto a RI, el modelo propuesto arroja que las variables edad y sexo son significativas, explicando alrededor de un 45% ($R^2 = 0,45$) de la variación en la frecuencia de MN; lo que está de acuerdo con lo informado en la literatura. Sobre la exposición a RI, esta variable queda justo por encima del valor de significancia estadística ($p = 0,060$) establecido como aceptable. Un efecto similar de la edad en la frecuencia de MN del grupo expuesto fue observado por Maffei et al. (2002); la falta de asociación estadística entre la frecuencia de MN y el sexo puede deberse a la baja cantidad de participantes mujeres dentro de la muestra estudiada. La pérdida de asociación entre la frecuencia de MN y la RI, podría deberse a la inducción de enzimas reparadoras hasta que se alcanza la saturación. Otro mecanismo podría referirse a la eliminación fisiológica de linfocitos con daño cromosómico. El modelo propuesto para el grupo no expuesto no es significativo. Resultados similares para el grupo no expuesto fueron reportados por (Eken et al., 2010), en donde las variables estudiadas de sexo y edad no influyeron en la frecuencia de MN. La frecuencia de MN encontradas en este grupo, pueden ser explicadas por variables que no fueron incluidas en el presente estudio. Es necesario generar información a nivel país sobre la frecuencia basal de MN de Costa Rica en la población general; así como estudiar las variables que expliquen la variabilidad en la frecuencia de MN a nivel basal.

A continuación se hará referencia a las variables en estudio para los modelos de regresión lineal múltiple de la muestra total y del grupo expuesto.

6.2.3. Edad del participante.

La edad fue la variable que mayor influencia mostró en la frecuencia de MN en los modelos de regresión lineal múltiple para la muestra total ($\beta = 0,543$) y el grupo expuesto a

RI (CE $\beta = 0,717$). Se ha reportado con anterioridad que la mayor proporción de MN con la edad se produce por mecanismos aneugénicos asociados principalmente a la segregación aberrante de los cromosomas X y Y (Fenech & Bonassi, 2011; Guo et al., 2019; Norppa & Falck, 2003). Con la edad, los mecanismos de reparación son menos eficientes, de manera que se podrían acumular mutaciones, que a su vez podrían causar inestabilidad genética lo que se reflejaría en un aumento de la frecuencia de MN (Ferraz et al., 2016).

Se profundizará en este tema en la sección sobre la relación entre los mecanismos celulares de respuesta ante el daño radioinducido y la frecuencia de MN observada en estudios de biomonitordeo.

6.2.4. Sexo del participante.

En el análisis de regresión lineal múltiple el sexo resultó ser un factor que influencia la frecuencia de MN tanto en el modelo propuesto para la muestra total (CE $\beta = -0,536$) como para el modelo del grupo expuesto a RI (CE $\beta = -0,673$), siendo mayor la frecuencia de MN en mujeres que en hombres. Otros estudios han observado que las mujeres presentan una frecuencia significativamente mayor de MN en linfocitos periféricos con respecto a los hombres, las diferencias se pueden explicar por mecanismos aneugénicos, principalmente debido a defectos en el cinetocoro, que conducen a una tendencia del cromosoma X de quedar rezagado en anafase y ser incluido con mayor frecuencia en MN en comparación a autosomas y al cromosoma Y (Catalán et al., 2000; Ferraz et al., 2016; Luzhna et al., 2013b). Estudios en seres humanos han mostrado poca o nula asociación del efecto de hormonas sexuales femeninas con la mayor frecuencia de MN observada en mujeres (Baeyens et al., 2005; Kayani & Parry, 2008).

6.2.5. Exposición a RI

En el modelo de regresión lineal múltiple para la muestra total, la exposición a RI es un factor que influye en la frecuencia de MN (CE $\beta = 0,347$). Confirmando lo descrito en la literatura de que el daño radioinducido al ADN es un fenómeno estocástico cuya probabilidad aumenta con respecto a la dosis de RI, por tanto, la cantidad de MN inducidos por RI se encuentra correlacionado con la dosis (y tipo de radiación) a la que es expuesto el individuo (Baeyens et al., 2011; Duncan et al., 2018; Durante & Formenti, 2018; Kang et al., 2016; Pajic et al., 2014; Rastkhah et al., 2016; Ryu et al., 2016). Es importante considerar que en este modelo contamos con personas que no toman ninguna radiografía por día, caso contrario al del modelo de expuestos, donde el valor de comparación es de alrededor de 5 radiografías por día.

En el presente estudio se consultó al participante por la cantidad de radiografías que realizaba por día, esta variable fue considerada como indicador de exposición a RI. Y si bien, una mayor cantidad de radiografías adquiridas podría asociarse con una mayor exposición a RI, es importante reconocer que este no es un parámetro ideal para estimar el nivel de exposición a RI debido a que este parámetro no considera circunstancias que pueden influir en la exposición como el tipo de tecnología utilizada (radiología digital o analógica), niveles de radiación de fuga del equipo de rayos X, dosis o técnica radiológica utilizada, cantidad de veces que el participante tuvo que sostener directamente al animal, incidencia del haz primario o disperso con respecto a la posición del personal y presencia de blindaje en la consola de control del equipo de rayos X. Este parámetro fue utilizado como tal a causa de la falta de uso de dosímetros personales en un porcentaje del POE que componía la muestra del grupo expuesto.

La posible imprecisión con que el parámetro de cantidad de radiografías realizadas estima el nivel de exposición ocupacional, podría explicar en parte la no significancia de la variable

“exposición a RI” en el modelo de regresión lineal múltiple para el grupo expuesto. De igual forma podría pensarse que la exposición dentro del grupo expuesto es lo suficientemente homogénea como para que la prueba no pueda detectar pequeños cambios en la exposición (esto se discutirá con más detalle posteriormente: en el apartado de limitaciones del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis). Por lo tanto, la aparente no influencia del nivel de exposición a RI sobre la frecuencia de MN en este grupo, puede deberse a poca diferencia interindividual en el grado de exposición entre los participantes, así como una imprecisión en el uso de cantidad de radiografías promedio por día como estimador del nivel de exposición ocupacional.

El efecto gradual de la exposición a RI sobre la frecuencia de MN podría reflejarse mejor utilizando el registro de dosimetría física como parámetro de exposición, así como aumentando el tamaño de la muestra con los mismos criterios de inclusión y exclusión del presente estudio.

6.2.5.1. Relación entre los mecanismos celulares de respuesta ante el daño radioinducido y la frecuencia de MN observada en estudios de biomonitoreo.

A la hora de analizar datos sobre frecuencias de MN en el contexto del biomonitoreo del personal expuesto a RI, debe tomarse en cuenta la capacidad celular de respuesta ante los distintos niveles de complejidad de daño radioinducido al ADN en relación con la LET de la RI a la que se expone el individuo. La relación entre la capacidad de respuesta al daño y la frecuencia de MN se ha observado con anterioridad, basándose en el hecho de que el genotipo de un individuo puede influir sobre la frecuencia de MN observada. Específicamente, polimorfismos en distintos genes de sistemas de reparación de ADN (XRCC3, XRCC1, XPD) demuestran influir en la formación de MN, aumentando su frecuencia cuando el individuo es expuesto a distintas dosis de RI (Angelini et al., 2005; Cho et al., 2009; Dhillon et al., 2011;

larmarcovai et al., 2008; F. Zakeri et al., 2017). Solo aquellos fragmentos cromosómicos o cromatídicos que no sean reparados, son los que quedarán rezagados durante la anafase y posteriormente formarán parte de MN (Fenech et al., 2011). Por esta razón, los mecanismos de reparación del ADN pueden influir en la frecuencia de MN observada, pues no todas las lesiones radioinducidas podrían traducirse en MN. Sin embargo, existe la posibilidad de que algunos fragmentos acéntricos sean unidos por acción de los mecanismos de reparación del ADN en una posición cromosómica diferente a la original, resultando en reordenamientos cromosómicos (Deriano & Roth, 2013).

De forma general, las RI son capaces de producir daños aislados al ADN como RSC, sitios carentes de base, daño oxidativo en las bases nitrogenadas y a la cadena de desoxirribosa-fosfato pero también daños como RDC, entrecruzamientos entre ADN y proteínas y lesiones agrupadas. La distribución del tipo y complejidad de las lesiones producidas en el ADN es influenciada por la LET de la RI (Carter et al., 2018; Nikitaki et al., 2016; X. Zhang et al., 2016). Se han realizado estimaciones con respecto a la distribución de tipos de lesiones inducidas por RI de baja LET, por cada 1 Gy de RI se inducen alrededor de 1000 RSC, 2000 daños de bases, 250 sitios abásicos, 40 RDC, 150 entrecruzamientos entre proteínas y ADN (Sage & Shikazono, 2017).

La complejidad de las lesiones radioinducidas al ADN no solo se describe por el tipo de lesión (RSC, RDC, etc.) sino también por la cercanía entre sí con que ocurren, pudiendo ser entonces lesiones aisladas o agrupadas. Lesiones aisladas como RSC y bases oxidadas son resueltas con eficiencia y precisión a través del sistema de reparación por escisión de bases (BER) y producidas preferentemente por RI de baja LET. Estimaciones realizadas en cultivos de monocitos humanos expuestas a rayos X (RI de baja LET) indican que este tipo de lesiones representan alrededor del 80% del total de lesiones radioinducidas; y son de 3 a 4 veces más

frecuentes que las lesiones agrupadas como las RDC (Sage & Shikazono, 2017).

Las lesiones agrupadas (dos RSC separadas por menos de 10 pares de bases, constituyen una RDC), por su distribución espacial y posible alteración en la secuencia de nucleótidos, tienden a representar un evento cuya resolución es de mayor complejidad y cuya probabilidad de ser reparado, es menor que en el caso de lesiones aisladas (Forster et al., 2019).

En el caso de las RDC, existen varios mecanismos de reparación involucrados, los cuales presentan precisión de reparación y cinéticas de acción distintas, influyendo en el desenlace final para la célula dañada (Hagiwara et al., 2019; Sage & Shikazono, 2017).

El principal mecanismo de reparación de RDC radioinducidos que preferentemente se verá involucrado, depende en primera instancia, de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula expuesta. En células de mamíferos, la UENH repara RDC a lo largo del ciclo celular y la RH participa en las fases S/G2 (Shibata, 2017). Considerando que las células humanas (incluyendo linfocitos periféricos) se encuentran generalmente en un estado de quiescencia (G0) (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), el principal mecanismo de reparación de RDC es la UENH canónica e intervienen en menor medida la recombinación homóloga y la UENH alternativa (en humanos parecen no contribuir de forma significativa durante las fases G0/G1) (Forster et al., 2019).

Se considera que la UENH canónica tiene dos componentes con cinéticas distintas: 1) un componente rápido (2-4 horas) que no se asocia con resección de los extremos dañados, con menor tendencia a inducir errores en la secuencia dañada y 2) un componente lento (más de 8 horas), que involucra la resección de los extremos dañados y más propenso a inducir errores (Forster et al., 2019). La proporción de acción de cada componente de la UENH depende de la complejidad de la lesión radioinducida, RDC de mayor complejidad son reparadas preferentemente a través de vías lentas y las RDC simples o de menor complejidad a través

de vías rápidas. Es relevante mencionar que las RI inducen lesiones cuyos extremos deben experimentar resección debido a que contienen bases oxidadas o daños en el esqueleto de desoxirribosa antes de que sean reparadas (Iliakis et al., 2015).

Las RI a las que se expone la muestra de personal veterinario estudiado se tratan de rayos X de bajas energías y de baja LET, radiación asociada con la formación preferente de lesiones aisladas (RSC y bases dañadas), que son reparadas eficazmente por BER; y en menor medida se producen RDC que se asocian con la formación de fragmentos cromosómicos y cromatídicos, que son reparadas por el componente lento de la UENH canónica (Sage & Shikazono, 2017; Timm et al., 2018). Aunque los fragmentos radioinducidos sean unidos nuevamente a un cromosoma y no lleguen a formar parte de MN, durante la reparación mediante UENH, debe considerarse el impacto que pueden tener cambios en el marco de lectura de secuencias biológicamente relevantes por errores generados durante los mecanismos de reparación, ya sea por traslocaciones cromosómicas o por pérdida de segmentos de la secuencia de nucleótidos de ADN (Deriano & Roth, 2013).

A pesar de que algunas de las células con daños pueden ser eliminadas de forma selectiva, a niveles de exposición para diagnóstico radiológico, las células sobrevivientes cuyos daños no hayan sido reparados pueden portar mutaciones que podrían superponerse con aquellas preexistentes por herencia, metabolismo, radiación de fondo o exposición a otros agentes genotóxicos (Deriano & Roth, 2013; Martincorena & Campbell, 2015).

6.2.6. Limitaciones del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis.

El procedimiento de MNBC utilizado en la presente investigación puede ser modificado brindándole mayor sensibilidad a la prueba. En primera instancia pueden incluirse otros biomarcadores como los puentes nucleoplásmicos, brotes nucleares y células necróticas o

apoptóticas. Con estas variaciones, el ensayo se conoce con el nombre de micronucleos-citoma y brinda información adicional al daño al ADN como su reparación, citostásis y citotoxicidad (Sommer et al., 2020). En el presente estudio si se registró la presencia de puentes nucleoplásmicos, sin embargo, solo fueron observados en dos ocasiones, por lo que no fueron incluidos en el análisis estadístico.

Los MN pueden formarse por mecanismos clastogénicos o aneugénicos. Factores como la edad, sexo y consumo de alcohol pueden influir en la frecuencia de MNs que contienen cromosomas completos (centroméricos) y asociados con mecanismos aneugénicos (Fenech et al., 2011; Luzhna et al., 2013a; Sommer et al., 2020). Por otro lado, las RI se consideran agentes principalmente clastogénicos, de tal forma que induce la formación de rupturas en la molécula de ADN y la formación de fragmentos acéntricos que serán incluidos en MNs (Durante & Formenti, 2018; Luzhna et al., 2013a; H. Thierens et al., 2000). En el presente estudio no se diferenció el mecanismo que dio origen a los MNs observados. Una mejor clasificación del origen del MN podría afinar la contribución de las RI en la formación de MNs (Baeyens et al., 2011; Balajee et al., 2014; Fimognari et al., 1997; Kirsch-Volders et al., 2011b; F. Maffei, 2000; Suto et al., 2015b; Hubert Thierens & Vral, 2009).

Si bien estos son puntos a considerar para el mejoramiento del MNBC, la utilidad de la prueba descrita y empleada en la presente investigación se haya ampliamente documentada (Sari-Minodier et al., 2007; Sierra, 2011; Velickova et al., 2015; Farideh Zakeri & Hirobe, 2010).

6.2.7. Variables no incluidas en los modelos finales de regresión lineal múltiple.

La asiduidad con que se consume alcohol es un factor que puede influir en la frecuencia de MN. Un consumo excesivo o habitual de alcohol se ha asociado con un aumento en la frecuencia basal (Castelli et al., 1999; Ishikawa, Miyatsu, Kurihara, & Yokoyama, 2006; F. Maffei,

2000; Francesca Maffei, Forti, et al., 2002). El alcohol induce la formación de MNs principalmente mediante mecanismos aneugénicos (Parry et al., 2002). De igual forma, en estudios *in vitro* se ha observado que el alcohol etílico es capaz de inducir MN en distintas líneas celulares, incluidos linajes de la línea linfóide (Benassi-Evans & Fenech, 2011). Según los modelos de regresión lineal preliminares del presente estudio (ver anexos) no se observó influencia del consumo del alcohol en la frecuencia de MN, lo que podría reflejar el hecho de que la mayoría de la muestra registra consumo bajo de alcohol, tal vez lo suficientemente bajos como para no influir en la frecuencia de MN.

En la muestra estudiada se registró el uso de sustancias químicas en los que se ha documentado con anterioridad aumentos en la frecuencia de MN, a través de mecanismos clastogénicos como el formaldehído (Speit et al., 2011), el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (Jovtchev et al., 2010) el fipronil (Badgujar et al., 2017) y la cipermetrina (Kocaman & Topaktaş, 2010). Existe poca evidencia de que el glifosato produzca MN, tanto *in vitro* como *in vivo* (Williams et al., 2016). En los modelos de regresión lineal preliminares (ver anexos), no se observó influencia de la exposición de sustancias químicas en la frecuencia de MN. No se consultó al participante sobre la frecuencia con la que utilizaba estas sustancias químicas ni sobre las precauciones que tomaba durante su manipulación. Una baja dosis de exposición, por debajo de un posible umbral, podría explicar los resultados obtenidos (Kirkland & Müller, 2000; Speit et al., 2011).

7. Conclusiones

En respuesta a los objetivos planteados y el análisis realizado sobre los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El MNBC es una herramienta útil en el monitoreo del daño al ADN producto de la exposición ocupacional a RI en personal veterinario.
2. Se cuenta con la prueba de MNBC estandarizada, permitiendo su disponibilidad para futuras investigaciones que se realicen en el Servicio de Dosimetría Biológica del Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica.
3. El análisis univariado presenta limitaciones para la determinación de las variables que influyen en la frecuencia de MN en la muestra estudiada.
4. La variabilidad en la frecuencia de MN observada en la muestra total se encuentra influenciada por la edad, sexo y nivel de exposición a RI del participante.
5. En el grupo expuesto, la variabilidad está influida por la edad y el sexo del participante.
6. La variabilidad en la frecuencia de MN en el grupo de no expuestos estaría explicada por factores no considerados en el presente estudio.
7. Bajo la metodología utilizada en el presente estudio, no es posible identificar aquellos MNs de origen meramente clastogénico inducidos por RI.
8. Se cumplió con el objetivo de brindar una charla informativa sobre los principios de protección radiológica y radiobiología a POE.

8. Recomendaciones

1. Se recomienda el uso de biomarcadores citogenéticos en el biomonitoreo ocupacional del POE, tanto en medicina veterinaria como en otras áreas del quehacer humano en donde se utilicen RI.
2. Para futuras investigaciones se recomienda el aumento del tamaño de la muestra,

así como la inclusión de parámetros biológicos adicionales en el MNBC como el registro de brotes nucleares y células necróticas o apoptóticas. Además del uso de sondas pancentroméricas para lograr identificar MN originados a partir de fragmentos acéntricos, tales como los producidos por RI. Estas modificaciones en el ensayo podrían aumentar la sensibilidad de la prueba para detectar daño al ADN inducido por exposición a RI.

3. Se debe incentivar la realización de estudios experimentales *in vitro* que permitan fortalecer la técnica del MNBC y ampliar nuestro conocimiento sobre la respuesta celular al daño radioinducido al ADN a bajas dosis de exposición. Una de las interrogantes que podrían impulsar estos estudios es conocer cuál es la mínima dosis de exposición a la que el MNBC puede ser utilizado para biomonitoreo.
4. Se deben realizar estudios de biomonitoreo del POE con el MNBC, en áreas de la medicina humana donde la dosis podría considerarse mayor a las que podrían haber ocurrido en el presente estudio, tales como radiología intervencionista y la medicina nuclear, para lograr determinar el posible riesgo ocupacional en estas poblaciones.
5. Deben fortalecerse las buenas prácticas de protección radiológica en la práctica veterinaria, mediante el uso de dosímetros personales, la integración de personal debidamente entrenado en la adquisición de imágenes radiográficas y radioprotección.
6. Debido a que el POE debe usualmente sujetar al animal para lograr una determinada posición y por ello podría elevarse la exposición a extremidades, se debería considerar si es suficiente el uso de dosímetros de cuerpo entero para lograr una estimación de la dosis recibida, o por si al contrario deben utilizarse dosímetros específicos de extremidades.

7. Deben propiciarse espacios de capacitación continua para el POE en principios y fundamentos de la protección radiológica, optimización en el posicionamiento y adquisición de imágenes radiológicas, así como en los efectos biológicos de las RI. Incluso podría considerarse a futuro el desarrollo de estrategias de entrenamiento en protección radiológica para el personal veterinario.
8. Se considera necesario revisar y reforzar la normativa vigente sobre protección contra RI, con el objetivo de la estandarización y optimización de la práctica radiológica en la veterinaria y lograr el menor impacto sobre la salud del POE y del público general como consecuencia del uso de las RI.
9. Para futuras investigaciones se recomienda que el instrumento de recolección de datos sea una entrevista. Esto podría evitar confusiones en preguntas que puedan ir dirigidas exclusivamente al POE y no al participante no expuesto, también evitaría la posible pérdida de datos relevantes.
10. Es importante aumentar la información sobre la frecuencia basal de MN en la población general, así como estudiar las variables que expliquen su variabilidad.

9. Bibliografía

Angelini, S., Kumar, R., Carbone, F., Maffei, F., Forti, G. C., Saverio Violante, F., Lodi, V., Curti, S., Hemminki, K., & Hrelia, P. (2005). Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutation Research*. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.10.007>

- Antonin, W., & Neumann, H. (2016). Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 15–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.013>
- Badie, C., Hess, J., Zitzelsberger, H., & Kulka, U. (2016). Established and Emerging Biomarkers of Radiation Exposure. *Clinical Oncology*.
<https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.06.002>
- Baeyens, A., Swanson, R., Herd, O., Ainsbury, E., Mabheng, T., Willem, P., Thierens, H., Slabbert, J. P., & Vral, A. (2011). A semi-automated micronucleus-centromere assay to assess low-dose radiation exposure in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 87(9), 923–931. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.577508>
- Baeyens, A., Vandersickel, V., Thierens, H., De Ridder, L., & Vral, A. (2005). Effects of estradiol and progesterone on the variability of the micronucleus assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 578, 308–316.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.05.013>
- Balajee, A. S., Bertucci, A., Taveras, M., & Brenner, D. J. (2014). Multicolour FISH analysis of ionising radiation induced micronucleus formation in human lymphocytes. *Mutagenesis*.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geu041>
- Baldwin, J., & Grantham, V. (2015). Radiation Hormesis : Historical and Current Perspectives. *J Nucl Med Technol*, 43(4), 242–247. <https://doi.org/10.2967/jnmt.115.166074>
- Banerjee, S., Singh, N., Sreedhar, G., & Mukherjee, S. (2016). Analysis of the Genotoxic Effects of Mobile Phone Radiation using Buccal Micronucleus Assay: A Comparative Evaluation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(3), 82–85.
- Bunting, S. F., & Nussenzweig, A. (2013). End-joining, translocations and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 443–454. <https://doi.org/10.1038/nrc3537>

- Bushberg, J., Seibert, J., Leidholdt, E., & Boone, J. (2012). *The essential physics of medical imaging* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Calzone, K. (2012). Genetic Biomarkers of Cancer Risk. *Seminars in Oncology Nursing*, 28(2), 122–128.
- Camacho, A. (2017). *Propuesta para el fortalecimiento del servicio de radiología del Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Universidad Nacional de Costa Rica, a partir del diagnóstico de los procedimientos empleados para los diferentes estudios, durante el período*. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Campbell, H. G., Mehta, R., Neumann, A. A., Rubio, C., Baird, M., Slatter, T. L., & Braithwaite, A. W. (2013). Activation of p53 following ionizing radiation, but not other stressors, is dependent on the proline-rich domain (PRD). *Oncogene*, 32(7), 827–836.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.102>
- Cannan, W. J., & Pederson, D. S. (2016). Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*, 231(1), 3–14.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.
- Cardarelli, J. J., & Ulsh, B. A. (2018). It is time to move beyond the linear no-threshold theory for low-dose radiation protection. *Dose-Response*, 16(3).
<https://doi.org/10.1177/1559325818779651>
- Carter, R. J., Nickson, C. M., Thompson, J. M., Kacperek, A., Hill, M. A., & Parsons, J. L. (2018). Complex DNA Damage Induced by High Linear Energy Transfer Alpha-Particles and Protons Triggers a Specific Cellular DNA Damage Response. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 100(3), 776–784.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.11.012>
- Castro, R., Ramírez, V., & Cuenca, P. (2004). Micronúcleos y otras anomalías nucleares

en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical*, 52(3).

Catalán, J., Surrallés, J., Falck, G. C. M., Autio, K., & Norppa, H. (2000). Segregation of sex chromosomes in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 15(3), 251–255.

<https://doi.org/10.1093/mutage/15.3.251>

Chapman, D., & Nahum, A. (2015). *Radiotherapy Treatment Planning: Linear-Quadratic Radiobiology*. CRC Press.

Cho, Y. H., Kim, Y. J., An, Y. S., Woo, H. D., Choi, S. Y., Kang, C. M., & Chung, H. W. (2009). Micronucleus-centromere assay and DNA repair gene polymorphism in lymphocytes of industrial radiographers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.08.007>

Coeytaux, K., Bey, E., Christensen, D., Glassman, E. S., Murdock, B., & Doucet, C. (2015). Reported radiation overexposure accidents worldwide, 1980-2013: A systematic review. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118709>

Cronenwett, J., & Johnston, K. (2018). *Rutherford's vascular surgery* (9th ed.). Elsevier.
Decreto Ejecutivo 24037- S, Reglamento Sobre Protección Contrás las Radiaciones Ionizantes. (1994).

http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=15464&nValor3=76357&strTipM=TC

Deriano, L., & Roth, D. B. (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annual Review of Genetics*, 47, 433–455. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155540>

Dhawa, A., & Bajpayee, M. (2013). *Genotoxicity assessment*. Humana Press.

Dhillon, V. S., Thomas, P., Iarmarcovai, G., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., & Fenech, M.

(2011). Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes.

Mutagenesis, 26(1), 33–42. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq076>

Dias, F. L., Antunes, L. M. G., Rezende, P. A., Carvalho, F. E. S., Silva, C. M. D., Matheus, J. M., Oliveira, J. V., Lopes, G. P., Pereira, G. A., & Balarin, M. A. S. (2007). Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.10.003>

Doss, M. (2013). Linear no-threshold model vs. radiation hormesis. *Dose-Response*.
<https://doi.org/10.2203/dose-response.13-005.Doss>

Duncan, J. R., Lieber, M. R., Adachi, N., & Wahl, R. L. (2018). Radiation dose does matter: Mechanistic insights into DNA damage and repair support the linear no-threshold model of low-dose radiation health risks. *Journal of Nuclear Medicine*, 59(7), 1014–1016.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.118.210252>

Durante, M., & Formenti, S. C. (2018). Radiation-induced chromosomal aberrations and immunotherapy: Micronuclei, cytosolic DNA, and interferon-production pathway. *Frontiers in Oncology*, 8, 192–202. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00192>

Eken, A., Aydin, A., Onur, E., Akay, C., Sanal, H., Soykut, B., Sayal, A., & Somuncu, I. (2010). Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of hospital staff occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Toxicology and Industrial Health*, 26(5), 273–280.

Falck, G. (2014). *Micronuclei in Human Peripheral Lymphocytes – Mechanistic Origin and Use as a Biomarker of Genotoxic Effects in Occupational Exposure*.

Fenech, M., & Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA

damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood

lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43–49. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq050>

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003).

HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block

micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research -*

Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 534(1–2), 65–75.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surrallés, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa,

H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of

micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human

cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>

Fenech, M., & Morley, A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation*

Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 147(1), 29–36.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)

Ferraz, G. A., Costa Neto, A. de O., Cerqueira, E. de M. M., & Meireles, J. R. C. (2016).

Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities.

Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, 19(4), 627–634.

<https://doi.org/10.1590/1809-98232016019.150155>

Fimognari, C., Sauer-Nehls, S., Braselmann, H., & Nüsse, M. (1997). Analysis of radiation-

induced micronuclei by FISH using a combination of painting and centromeric DNA

probes. *Mutagenesis*, 12(2), 91–95. <https://doi.org/10.1093/mutage/12.2.91>

Forster, J. C., Douglass, M. J. J., Phillips, W. M., & Bezak, E. (2019). Stochastic multicellular

modeling of x-ray irradiation, DNA damage induction, DNA free-end misrejoining and cell

death. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54941-1>

- Freeman, A. K., & Monteiro, A. N. A. (2010). Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Communication and Signaling*, 8(27). <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-27>
- Gaziev, A., & Shaikhaev, G. (2012). Limited Repair of Critical DNA Damage in Cells Exposed to Low Dose Radiation. In M. Neno (Ed.), *Current Topics in Ionizing Radiation Research* (pp. 50–80). InTech.
- Giaccia, E., Hall, J., & Amato, J. (2012). *Radiobiology for the radiologist* (7th ed.). Lippincott Williams & Williams.
- Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Johnson, J. P., Piette, J., & Krutmann, J. (2000). Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. *The EMBO Journal*, 19(21), 5793–5800. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5793>
- Guo, X., Ni, J., Liang, Z., Xue, J., Fenech, M. F., & Wang, X. (2019). The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.11.001>
- Hagiwara, Y., Oike, T., Niimi, A., Yamauchi, M., Sato, H., Limsirichaikul, S., Held, K. D., Nakano, T., & Shibata, A. (2019). Clustered DNA double-strand break formation and the repair pathway following heavy-ion irradiation. *Journal of Radiation Research*, 60(1), 69–79. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry096>
- Hamada, N., & Fujimichi, Y. (2014). Classification of radiation effects for dose limitation purposes: History, current situation and future prospects. In *Journal of Radiation Research*. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru019>
- Hernández-Ruiz, L., Jimenez-Flores, Y., Rivera-Montalvo, T., Arias-Cisneros, L., Méndez-

Aguilar, R. E., & Uribe-Izquierdo, P. (2012). Thermoluminescent dosimetry in veterinary diagnostic radiology. *Applied Radiation and Isotopes*, 71, 44–47.

<https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.06.023>

Huda, W. (2016). *Review of radiologic physics* (4th ed.). Wolters Kluwer.

Hupe, O., & Ankerhold, U. (2011). Determination of the dose to persons assisting when x-radiation is used in medicine, dentistry and veterinary medicine. *Radiation Protection Dosimetry*, 144, 478–481. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq351>

Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A., & Orsière, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 658, 215–233.

<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.001>

Iliakis, G., Murmann, T., & Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 166–175.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.001>

International Atomic Energy Agency. (2010). *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students* (International Atomic Energy Agency (Ed.)).

International Atomic Energy Agency. (2018). *Occupational Radiation Protection*. International Atomic Energy Agency. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/PUB1785_web.pdf

Ivashkevich, A., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, R. F., & Martin, O. A. (2012). Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, 327(1–2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.025>

- Joiner, M. (2010). *Basic Clinical Radiobiology* (4th ed.). Taylor & Francis.
- Jones, K. H., York, T. P., & Jackson-Cook, C. (2012). Mechanisms leading to the formation of micronuclei containing sex chromosomes differ with age. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(2), 207–217.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.05.004>
- Kang, C. M., Yun, H. J., Kim, H., & Kim, C. S. (2016). Strong correlation among three biodosimetry techniques following exposures to ionizing radiation. *Genome Integrity*, 7(11). <https://doi.org/10.4103/2041-9414.197168>
- Kayani, M. A., & Parry, J. M. (2008). The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the in vitro cytokinesis blocked micronucleus assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 651, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.007>
- Kelley, M., & Fishel, M. (2016). *DNA repair in cancer therapy* (2nd ed.). Elsevier.
- Khoronenkova, S. V., & Dianov, G. L. (2015). ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416031112>
- Kiessling, F., & Pichler, B. J. (2017). Small animal imaging: Basics and practical guide. In *Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide* (2nd ed.). Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-12945-2>
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., & Decordier, I. (2011a). The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 85(8), 873–899. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0691-4>
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., &

Decordier, I. (2011b). The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. In *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0691-4>

Kisurina-Evgenieva, O. P., Sutiagina, O. I., & Onishchenko, G. E. (2016). Biogenesis of micronuclei. *Biochemistry (Moscow)*. <https://doi.org/10.1134/S0006297916050035>

Korbel, J. O., & Campbell, P. J. (2013). Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.023>

Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J. (2014). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (9th ed.). Elsevier.

Kwon, H., Lee, H., Park, M., Park, H., Kim, T., Ji, Y., Kim, K., Lee, S., Lee, Y., Cho, C., Choi, S., & Kang, C. (2005). *Spontaneous and radiation-induced micronucleus frequencies in low dose radiation- exposed worker ' s peripheral blood lymphocytes*.

Lavelle, C., & Foray, N. (2014). Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: From structural biology to radiobiology. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 49, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.012>

Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>

Lin, X., Yan, J., & Tang, D. (2013). ERK kinases modulate the activation of PI3 kinase related kinases (PIKKs) in DNA damage response Histology and. *Histol Histopathol*, 2013(28), 1547–1554.

Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>

Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013a). Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4(JUL), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>

Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013b). Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. In *Frontiers in Genetics*.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>

Ly, P., & Cleveland, D. W. (2017). Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. In *Trends in Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.005>

Mackinnon, R. N., & Campbell, L. J. (2013). Chromothripsis under the microscope: A cytogenetic perspective of two cases of AML with catastrophic chromosome rearrangement. *Cancer Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.05.021>

Maffei, F. (2000). Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis*, 15, 517–523.
<https://doi.org/10.1093/mutage/15.6.517>

Maffei, Francesca, Angelini, S., Forti, G. C., Lodi, V., Violante, F. S., Mattioli, S., & Hrelia, P. (2002). Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis*, 17(5), 405–409. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.5.405>

Maffei, Francesca, Moraga, J. M. Z., Angelini, S., Zenesini, C., Musti, M., Festi, D., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2014). Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk. *Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu007>

Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced

DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal*, 417(3), 639–650. <https://doi.org/10.1042/BJ20080413>

Maher, C. A., & Wilson, R. K. (2012). Chromothripsis and human disease: Piecing together the shattering process. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.006>

Martincorena, I., & Campbell, P. J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349(6255), 1483–1489. <https://doi.org/10.1126/science.aab4082>

Milosević-Djordjević, O., Grujicić, D., Vasković, Z., & Marinković, D. (2010). High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 220(2), 115–120. <https://doi.org/10.1620/tjem.220.115>

Morishita, M., Muramatsu, T., Suto, Y., Hirai, M., Konishi, T., Hayashi, S., Shigemizu, D., Tsunoda, T., Moriyama, K., & Inazawa, J. (2016). Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam irradiation system. *Oncotarget*, 7(9), 10182–10192. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7186>

Muller, H. (1930). The frequency of translocations produced by x-rays in *Drosophila*. *Genetics*, 15(1), 283–311.

Nájera, A., & Arribas, E. (2015). *Fundamentos de física para profesionales de la salud*. Elsevier.

Nefic, H., & Handzic, I. (2013). The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 753(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.001>

Nikitaki, Z., Nikolov, V., Mavragani, I. V., Mladenov, E., Mangelis, A., Laskaratou, D. A., Fragkoulis, G. I., Hellweg, C. E., Martin, O. A., Emfietzoglou, D., Hatzi, V. I., Terzoudi, G.

I., Iliakis, G., & Georgakilas, A. G. (2016). Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET). *Free Radical Research*, 50(sup1), S64–S78.

<https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1232484>

Norppa, H., & Falck, G. C. M. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18(3), 221–233. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.3.221>

Organismo Internacional de Energía Atómica. (2014). *Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas*. Organismo Internacional de Energía Atómica.

Organismo Internacional de Energía Atómica. (2016). Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas internacionales de seguridad. In *Organismo Internacional de Energía Atómica*. Organismo Internacional de Energía Atómica.

Özdağ, A., Erselcan, T., Özdemir, Ö., Silov, G., Erdoğan, Z., & Turhal, Ö. (2016). Micronucleus frequencies in groups receiving external or internal radiation. In *Indian Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 31, Issue 3, p. 179). <https://doi.org/10.4103/0972-3919.183621>

Pajic, J., Rakic, B., Jovicic, D., & Milovanovic, A. (2014). Construction of dose response calibration curves for dicentric and micronuclei for X radiation in a Serbian population. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 773, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.07.009>

Panayi, N., Mendoza, E., Breshears, E., & Burd, R. (2013). Aberrant Death Pathways in Melanoma. In *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma* (pp. 40–51). InTech. <https://doi.org/10.5772/55173>

Pollard, J. M., & Gatti, R. A. (2009). Clinical Radiation Sensitivity With DNA Repair Disorders: An Overview. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*.

<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.057>

- Purnami, S., Nurhayati, S., Syaifudin, M., & Ramadhani, D. (2017). Biological Dosimetry Using Micronucleus Assay in Simulated Partial-Body Exposure to Ionizing Radiation. *Atom Indonesia*, 43(2), 75–80.
- Qian, Q. Z., Cao, X. K., Shen, F. H., & Wang, Q. (2016). Effects of ionising radiation on micronucleus formation and chromosomal aberrations in Chinese radiation workers. *Radiation Protection Dosimetry*, 168(2), 197–203. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncv290>
- Ramírez, V., & Cuenca, P. (2001). Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Revista de Biología Tropical*, 2000(49), 1.
- Rassool, F. V., & Tomkinson, A. E. (2010). Targeting abnormal DNA double strand break repair in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0493-5>
- Rastkhah, E., Zakeri, F., Ghoranneviss, M., Rajabpour, M. R., Farshidpour, M. R., Mianji, F., & Bayat, M. (2016). The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose–response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 55, 41–51. <https://doi.org/10.1007/s00411-015-0624-3>
- Rawojć, K., Tarnawska, D. M., Miszczyk, J. U., Swakoń, J., Stolarczyk, L., & Rydygier, M. (2015). Application of the micronucleus assay performed by different scorers in case of large-scale radiation accidents. *Nukleonika*, 60(3), 643–649. <https://doi.org/10.1515/nuka-2015-0105>
- Reinhardt, H., & Yaffe, M. (2013). Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(9), 563–580.
- Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., & Furdui, C. M. (2014). Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of

Detection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 260–292.

<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>

Rodrigues, M. A., Beaton-Green, L. A., Kutzner, B. C., & Wilkins, R. C. (2014). Multi-parameter dose estimations in radiation biodosimetry using the automated cytokinesis-block micronucleus assay with imaging flow cytometry. *Cytometry Part A*, 85(10), 883–893. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22511>

Ryu, T. H., Kim, J. H., & Kim, J. K. (2016). Chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Genome Integrity*, 7(5). <https://doi.org/10.4103/2041-9414.197172>

Sabharwal, R., Verma, P., Syed, M., Sharma, T., Subudhi, S., Mohanty, S., & Gupta, S. (2015). Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. <https://doi.org/10.4103/0971-5851.171541>

Sacristán, M. (2015). *Modelado de Supervivencia Celular a Radiación Ionizante Basado en la Maximización de la Entropía de Tsallis* [Universidad Nacional de Educación a Distancia de España]. http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-FMed-Masacristan/Sacristan_Fernandez_Miguel_Angel_TCI.pdf

Sage, E., & Shikazono, N. (2017). Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>

Sahin, E., & Depinho, R. A. (2010). Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*, 464(7288), 520–528. <https://doi.org/10.1038/nature08982>

Sari-Minodier, I., Orsière, T., Auquier, P., Martin, F., & Botta, A. (2007). Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of

ionizing radiation. *Mutation Research*, 629(2), 111–121.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.01.009>

Schipler, A., & Iliakis, G. (2013). DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7589–7605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt556>

Schnelle, G. (1968). The History of Veterinary Radiology. *Veterinary Radiology*. *Veterinary Radiology*, 9(1), 5–10.

Shibai-Ogata, A., Tahara, H., Yamamoto, Y., Fujita, M., Satoh, H., Yuasa, A., Hioki, T., & Kasahara, T. (2014). An automated new technique for scoring the in vivo micronucleus assay with image analysis. *Mutagenesis*, 29(1), 63–71.
<https://doi.org/10.1093/mutage/get064>

Shibata, A. (2017). Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 803–805, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.011>

Siama, Z., Zosang-zuali, M., Vanlalruati, A., Jagetia, G. C., Pau, K. S., & Kumar, N. S. (2019). Chronic low dose exposure of hospital workers to ionizing radiation leads to increased micronuclei frequency and reduced antioxidants in their peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 95(6), 697–709.
<https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1571255>

Sierra, C. (2011). *Evaluación del efecto genotóxico de la Radiación Ionizante en médicos ortopedistas expuestos laboralmente, en cuatro instituciones de salud en Bogotá, Colombia 2011*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4).

<https://doi.org/10.3390/ijms21041534>

Suto, Y., Akiyama, M., Noda, T., & Hirai, M. (2015a). Construction of a cytogenetic dose-response curve for low-dose range gamma-irradiation in human peripheral blood lymphocytes using three-color FISH. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.10.002>

Suto, Y., Akiyama, M., Noda, T., & Hirai, M. (2015b). Construction of a cytogenetic dose-response curve for low-dose range gamma-irradiation in human peripheral blood lymphocytes using three-color FISH. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 794, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.10.002>

Terzic, S., Milovanovic, A., Dotlic, J., Rakic, B., & Terzic, M. (2015). New models for prediction of micronuclei formation in nuclear medicine department workers. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 10(25). <https://doi.org/10.1186/s12995-015-0066-5>

Thierens, H., Vral, A., Morthier, R., Aousalah, B., & De Ridder, L. (2000). Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis*, 15(3), 245–249. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.3.245>

Thierens, Hubert, & Vral, A. (2009). The micronucleus assay in radiation accidents. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 45(3), 260–264.

Timm, S., Lorat, Y., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., & Rube, C. E. (2018). Clustered DNA damage concentrated in particle trajectories causes persistent large-scale rearrangements in chromatin architecture. *Radiotherapy and Oncology*, 129(3), 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.07.003>

Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Nava, A., Flores-García, A., & Ramos-Ibarra, M. L.

- (2014). Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. In *Disease Markers*. <https://doi.org/10.1155/2014/956835>
- Vaiserman, A. M. (2010). Radiation hormesis: Historical perspective and implications for low-dose cancer risk assessment. *Dose-Response*, 8(2), 172–191.
<https://doi.org/10.2203/dose-response.09-037.Vaiserman>
- Velickova, N., Milev, M., Ruskovska, T., Petrova, B., Nedeljkovic, B., & Gorgieva, P. (2015). Cytogenetic abnormalities in lymphocytes evaluated with micronucleus assay in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Genetika*, 47(3), 927–939.
- Vignard, J., Mirey, G., & Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. In *Radiotherapy and Oncology*.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>
- Vral, A., Fenech, M., & Thierens, H. (2011). The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 11–17.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>
- Wang, H., Mu, X., He, H., & Zhang, X. D. (2018). Cancer Radiosensitizers. In *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.003>
- Willems, P., August, L., Slabbert, J., Romm, H., Oestreicher, U., Thierens, H., & Vral, A. (2010). Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events. *International Journal of Radiation Biology*.
<https://doi.org/10.3109/09553000903264481>
- Wolff, H. A., Hennies, S., Herrmann, M. K. A., Rave-Fränk, M., Eickelmann, D., Virsik, P., Jung, K., Schirmer, M., Ghadimi, M., Hess, C. F., Hermann, R. M., & Christiansen, H. (2011). Comparison of the micronucleus and chromosome aberration techniques for the documentation of cytogenetic damage in radiochemotherapy-treated patients with rectal

cancer. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 187(1), 52–58. <https://doi.org/10.1007/s00066-010-2163-9>

Zakeri, F., Farshidpour, M. R., & Rajabpour, M. R. (2017). Occupational radiation exposure and genetic polymorphisms in DNA repair genes. *Radioprotection*, 52(4), 214–249.

Zakeri, Farideh, & Hirobe, T. (2010a). A cytogenetic approach to the effects of low levels of ionizing radiations on occupationally exposed individuals. *European Journal of Radiology*, 73(1), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.10.015>

Zakeri, Farideh, & Hirobe, T. (2010b). A cytogenetic approach to the effects of low levels of ionizing radiations on occupationally exposed individuals. *European Journal of Radiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.10.015>

Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., Meyerson, M., & Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*, 522(7555), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature14493>

Zhang, X., Ye, C., Sun, F., Wei, W., Hu, B., & Wang, J. (2016). Both complexity and location of DNA damage contribute to cellular senescence induced by ionizing radiation. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155725>

10. Anexos.

10.1. Instrumento de recolección de datos

INSTRUMENTO No. 1

Código

--	--	--

Estimado participante los datos recopilados en este formulario son importantes en el momento de analizar los resultados y aumentar la exactitud de la investigación. Los datos recopilados en este formulario son confidenciales y se utilizarán solo para efectos de la investigación.

I. Identificación del participante.

1.1. Fecha de nacimiento (día/mes/año): ____ / ____ / ____

1.2. Edad en años: ____ 1.3. Sexo: ☐ 1.Fem. ☐ 2.Masc.

1.4. Peso aproximado ____ (kg): 1.5. Altura ____ (m):

II. Variables de estilo de vida.

2.1. ¿Usted fuma actualmente o fue fumador? (en caso afirmativo indicar la cantidad de cigarrillos diarios)

	Sí	No	
Sí fuma actualmente			¿Cuántos cigarrillos consume por día?
			¿Durante cuántos años ha fumado?
Si ha fumado en el pasado			¿Cuántos cigarrillos consumía por día?
			¿Durante cuántos años fumó?
Nunca ha fumado			

2.2. ¿Usted consume alcohol actualmente o lo ha consumido en el pasado?

	Sí	No		menos de 5 tragos	5-10 tragos	más de 10 tragos
Sí consume alcohol actualmente			¿Cuántos tragos consume a la semana?			
Si ha consumido alcohol en el pasado			¿Cuántos tragos consumía a la semana?			
			¿Hace cuánto tiempo dejó de consumir alcohol?: (años)			
Nunca ha consumido alcohol						

III. Exposición a agentes químicos.

3.1. ¿Trabaja usted con agentes químicos, o ha estado expuesto(a) plaguicidas? (si fuese posible, mostrar al investigador el empaque o contenedor de la sustancia)

	Sí	No	Nombre del o los agentes químicos

¿Trabaja con agentes químicos?			
¿Ha estado expuesto(a) a plaguicidas o pesticidas?			

IV. Historial de enfermedades.

4.1. ¿Ha padecido de cáncer? En caso afirmativo, indicar el tipo de enfermedad y los tratamientos que recibió.

	Sí	No	En caso de responder sí, responda las siguientes preguntas:				
¿Ha padecido de cáncer?			¿Qué tipo de cáncer?				
			¿Recibió quimioterapia?	Sí		No	
			¿Recibió radioterapia?	Sí		No	

4.2. Marque con una equis si padece alguna de las siguientes enfermedades en la casilla que corresponda.

Condición	Sí (ver pregunta 4.2)		No	No sabe
	Tipo 1	Tipo 2		

<i>Diabetes</i>				
<i>Mellitus</i>				

4.3. En caso de ser diabético, ¿Hace cuantos años fue realizado el diagnóstico? _____años

V. Historial de exposición a radiación.

5.1. ¿Trabaja usted con fuentes emisoras de radiaciones?

	Sí	No	En caso de responder sí, responda las siguientes preguntas:	
¿Trabaja usted con fuentes emisoras de radiaciones?			¿Desde hace cuánto tiempo?	años
			¿En cuántos procedimientos radiológicos participa por día?	al día
			¿Qué puesto desempeña en la clínica veterinaria?	
			¿Qué modelo de equipo radiológico utiliza? (en caso de ser posible mostrarlo al investigador)	

5.2. ¿Utiliza equipo de protección durante los procedimientos radiológicos?

	Sí	No	En caso de responder sí, especificar el equipo utilizado		
¿Utiliza equipo de protección durante los procedimientos radiológicos?			Equipo	Sí	No
			Chalecos plomados		
			Guantes plomados		
			Lentes plomados		
			Mamparas plomadas		
			Otros (especifique)		
	Sí	No			
¿Ha recibido capacitación en el área de la protección radiológica?					
¿Está interesado en recibir capacitación en el área de la protección radiológica?					

5.3. ¿Utiliza dosímetro durante su jornada laboral?

	Sí	No	En caso de responder sí, responder las siguientes preguntas:		
¿Utiliza dosímetro durante su jornada laboral?				Sí	No
			¿Tiene acceso a su historial dosimétrico?		
			¿Comprende la información contenida en su informe dosimétrico?		

5.4. ¿Está de acuerdo con brindar al investigador los datos de su historial dosimétrico?

☐ Sí (ver punto 5.5)
 ☐ No

5.5. En consecuencia, DOY MI CONSENTIMIENTO para la entrega al investigador de los datos de mi historial dosimétrico. Para estos efectos, firmo a las _____ horas del _____ de _____ del año dos mil diecisiete.

10.2. Formula de Consentimiento Informado



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ ÉTICO CIENTIFICO



Teléfonos:(506) 2511-4201 Telefax: (506) 2224-9367

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número de proyecto: 1400. “Estimación del riesgo radiológico en el personal expuesto en clínicas veterinarias” Nombre del Investigador

Principal: _____

Nombre del participante: _____

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO: En la práctica veterinaria el uso de la radiografía con rayos X es muy común, sobre todo en la identificación de fracturas, de objetos extraños que es posible que el animal haya consumido y en la cirugía ortopédica. Un sondeo entre las clínicas veterinarias del área metropolitana, ha descubierto que el veterinario(a) o el técnico(a), a menudo sujeta al animal durante la exposición a rayos X y que, por el momento, solamente en algunas clínicas se identificó que utilizan el dosímetro físico. Se desconoce, por lo tanto, el impacto a la salud del veterinario(a) que estas prácticas puedan tener y el riesgo de desarrollar incluso cáncer en el largo plazo. El objetivo de esta investigación es, por lo tanto, estimar el riesgo a la salud que se puede producir en la práctica de la medicina veterinaria, por exposición a rayos X, para concientizar a esta población en temas de protección radiológica. Vamos a utilizar un marcador biológico de daño cromosómico, producido por la exposición de la persona a la radiación X, a dosis bajas. El ensayo que usaremos se

llama micronúcleos, el cual está debidamente validado. Este es un estudio tipo caso – control, donde los casos son 30 veterinarios(as) o técnicos en veterinaria, que hacen uso habitual de la radiografía y el grupo control son 30 personas que no están expuestas a la radiación X. Si la diferencia en la frecuencia de micronúcleos no es significativa entre ambos grupos, esto quiere decir que los casos no tienen aumento de riesgo pese a trabajar con rayos X, pero si la frecuencia es mayor en los casos, esto significa que el personal veterinario que toma radiografías, tiene aumento del riesgo de tener consecuencias adversas para su salud y se deben tomar previsiones para disminuir al máximo este riesgo.

- B. ¿QUÉ SE HARÁ?:** se va a extraer una única muestra de 5 ml (una cucharadita) de sangre del antebrazo, tal y como lo hacen en los laboratorios para hacer exámenes rutinarios. Esta muestra de sangre se va a trasladar al laboratorio de Citogenética, del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la U.C.R., para su procesamiento antes de que pasen 24 horas.
- C. RIESGOS:** La participación en este estudio puede significar cierta molestia para usted por el dolor de la punzada y se le puede formar un pequeño moretón como consecuencia, pero esto es pasajero. Todo el material para la extracción de la muestra es estéril y desechable, de manera que no ofrece riesgo para el participante.
- D. BENEFICIOS:** Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio que obtendrá será conocer si tiene aumento del riesgo de sufrir consecuencias desfavorables para su salud debido a la exposición a rayos X. Si usted pertenece al grupo control, como resultado de su participación en este estudio, no obtendrá ningún beneficio directo, sin embargo, es posible que las investigadoras aprendan más acerca del ensayo de micronúcleos en la reconstrucción de la dosis absorbida de rayos X, por el personal que los utiliza y este conocimiento beneficie a otras personas en el futuro.
- E.** Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con Luisa Valle o con Melissa Abarca y ellas deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamando a Luisa o a Melissa al teléfono 2511-2140, 2511-2129 o 2511-2150 en el

horario de 8:00 am a 5:00 pm. Además, puede consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación a la Dirección de Regulación de Salud del Ministerio de Salud, al teléfono 2257-2090, de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m. Para cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 2511-4201 ó 2511-5839, de lunes a viernes de 8 a.m. a 5 p.m.

- F.** Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.
- G.** Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte su estado laboral.
- H.** Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica, pero de una manera anónima.
- I.** No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores de 12 años y adultos)

fecha

Nombre, cédula y firma del testigo

fecha

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento

fecha

NUEVA VERSIÓN FCI-APROBADO EN SESIÓN DE COMITÉ ETICO CIENTÍFICO (CEC) NO. 149
REALIZADA EL 4 DE JUNIO DE 2018.

CELM-Form.Consent–Inform 06-08

10.3. Resultados de evaluación de las preparaciones celulares del MNBC para análisis microscópico

Fwd: Fw: Rv: MN fotos



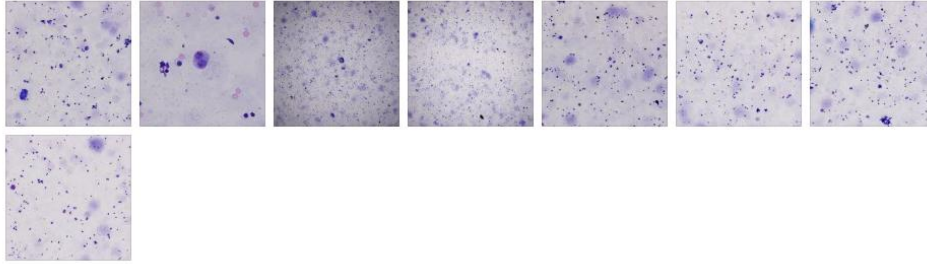
Luisa Valle B <luisavbourrouet@gmail.com>

19/08/2020 12:48 p. m.



Para: ANDRES CHAVES CAMPOS; VANESSA RAMIREZ MAYORGA

Guardar todos los datos adjuntos



Estas son las fotos que se enviaron a evaluar, reenvie respuestas de marina y Jorge Ernesto

----- Forwarded message -----

De: luisa valle bourrouet <vallebourrouet@yahoo.com>

Date: mié., 19 ago. 2020 a las 12:40

Subject: Fw: Rv: MN fotos

To: Andrea Chaves <andreachaves.biol@gmail.com>, luisa valle bourrouet <luisa.valle@ucr.ac.cr>, VANESSA RAMIREZ MAYORGA <vanessa.ramirez@ucr.ac.cr>

Esta fueron las fotos que se enviaron, puedes poner anexo, implementación o estandarización de la técnica

----- Mensaje reenviado -----

De: luisa valle bourrouet <vallebourrouet@yahoo.com>

Para: Radl Analia <aradl@arn.gob.ar>; Digiorgio Marina <mdigiorgio@arn.gob.ar>; Omar Francisco García Lima <omar@cphr.edu.cu>; cphrromar@ceniai.inf.cu <cphrromar@ceniai.inf.cu>; Jorge Ernesto González Mesa <jorgee@cphr.edu.cu>

CC: Luisa Valle Bourrouet <vallebourrouet@yahoo.com>

Enviado: martes, 11 de octubre de 2016 6:01:28 p. m. CST

Asunto: Rv: MN fotos

respuesta de marina



Luisa Valle B <luisavbourrouet@gmail.com>

01/09/2020 09:21 p. m.



Para: ANDRES CHAVES CAMPOS

El miércoles, 19 de agosto de 2020 12:36:14 p. m. CST, luisa valle bourrouet <vallebourrouet@yahoo.com> escribió:

Esta fue la Respuesta de Marina

----- Mensaje reenviado -----

De: Digiorgio Marina <mdigiorgio@arn.gob.ar>

Para: luisa valle bourrouet <vallebourrouet@yahoo.com>; Radl Analia <aradl@arn.gob.ar>; Jorge Ernesto González Mesa <jorgee@cphr.edu.cu>; Omar Francisco García Lima <omar@cphr.edu.cu>

CC: LUISA VALLE <luisa.valle@ucr.ac.cr>

Enviado: martes, 11 de octubre de 2016 7:37:46 p. m. CST

Asunto: RE: MN fotos 2

Hola Luisa,

Recibi bien las imágenes de tus dos correos. Las preparaciones son muy buenas. Es un excelente material para realizar el scoring.

Cariños, Marina

De: Jorge Ernesto González Mesa <jorgee@cphr.edu.cu>
Para: 'luisa valle bourrouet' <vallebourrouet@yahoo.com>
CC: Digorgio Marina <mdigiorgio@arn.gob.ar>; Radl Analía <aradl@arn.gob.ar>; 'Omar García Lima' <omar@cphr.edu.cu>
Enviado: Martes, 18 de octubre, 2016 9:38:49
Asunto: RE: MN fotos

Hola Luisa ,

Te adjunto resultado de análisis de calidad de las imágenes, se confirma que son de excelente calidad, incluso tomando en cuenta que fueron guardadas como jpg. El valor es superior en todos los casos al límite de aceptación.

FileName_MN	ImageNumber	ImageQuality_PowerLogLogSlope_MN	PathName_MN
10 40x.jpg	1	-1.703519446	D:\MN\CRC
11 40x.jpg	2	-1.66054342	D:\MN\CRC
12 40x.jpg	3	-1.652090341	D:\MN\CRC
13 40x.jpg	4	-1.414946156	D:\MN\CRC
14 40x.jpg	5	-1.391097566	D:\MN\CRC
15 4x.jpg	6	-0.546588475	D:\MN\CRC
4 4x.jpg	7	-0.71368982	D:\MN\CRC
5 10x.jpg	8	-0.828667526	D:\MN\CRC
6 10x.jpg	9	-0.788924506	D:\MN\CRC
7 10x.jpg	10	-0.976739531	D:\MN\CRC
8 10x.jpg	11	-0.847724762	D:\MN\CRC
9 10x.jpg	12	-0.990475459	D:\MN\CRC
Valor límite		-2.27	

10.4. Propuesta programática: Curso básico sobre protección radiológica para personal ocupacionalmente expuesto de servicios de medicina veterinaria

Objetivo

Al final de este curso el participante deberá conocer los conceptos básicos de física de las radiaciones ionizantes, magnitudes y unidades, efectos biológicos, principios y fundamentos de protección radiológica, las medidas para la manipulación segura de equipos radiológicos y aplicación de procedimientos específicos para el área de la radiología veterinaria.

Duración: 24 horas.

Metodología

El curso se desarrollará bajo una metodología que incluye clases magistrales, resolución de casos y pruebas escritas.

Presentación del programa.

El curso tiene un programa diseñado con el objeto de cumplir con los requisitos para la obtención y renovación de la licencia de emisor de radiaciones ionizantes del Ministerio de Salud de Costa Rica, según lo descrito en el “Reglamento Sobre Protección Contra las Radiaciones Ionizantes”. Además, busca que el participante logre aplicar sus conocimientos en su ejercicio profesional con la intención de proteger los intereses del paciente y garantizar una seguridad laboral en el uso de los Rayos X.

La práctica clínica en veterinaria ha mostrado una tendencia hacia la adopción cada vez mayor de técnicas diagnósticas que faciliten el manejo y desenlace de las patologías animales. Dentro de las técnicas adoptadas basadas en el diagnóstico por imagen se encuentra la radiografía, la fluoroscopia, la tomografía computarizada y otras metodologías cimentadas en el uso de radiaciones ionizantes (RI). Esto hace obligatorio que el personal en veterinario sea incluido en un programa de capacitación que le permita obtener conocimientos básicos de imagenología, radiofísica, radiobiología y de normas mínimas en protección radiológica.

El material didáctico será proveído por el instructor, quien se encargará de realizar la

investigación del material a partir de la bibliografía de referencia y otra adicional que considere necesaria.

Contenidos.

Introducción.

Tema # 1: Nociones de radiofísica para veterinaria.

- Introducción a las ciencias radiológicas.
- Radiaciones ionizantes.
- Modelos atómicos e inestabilidad nuclear.
- Radiaciones electromagnéticas y corpusculares
- Interacciones de la radiación X en radiología veterinaria
- Producción de rayos X en radiología veterinaria

Tema # 2: Equipos de radiología veterinaria

- Equipos convencionales (analógicos y digitales), fluoroscópicos y tomográficos.
- Factores que controlan la formación del haz de rayos X en los equipos de uso veterinario.
- Características generales de la radiografía analógica.
- Características generales de la radiografía digital.
- Control de calidad en radiología veterinaria.

Tema # 3: Magnitudes y unidades en protección radiológica para los servicios de veterinaria.

- Unidades de dosimetría radiológica.
- Medidas empleadas en radiología veterinaria.

Tema # 4: Principios de radiobiología.

- Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes.
- Efectos determinísticos y probabilísticos.
- Respuesta celular, tisular y sistémica a la exposición a radiaciones.
- Tolerancias tisulares.
- Signos y síntomas de la sobreexposición a las radiaciones ionizantes.

Tema # 5: Detección y medición de la radiación ionizante

- Instrumentos de medición y detección de las radiaciones ionizantes.
- Dosimetría biológica.

Tema # 7: Buenas prácticas de protección radiológica en veterinaria.

- Principios de la protección radiológica
- Fundamentos de la protección radiológica.
- Clasificación y monitoreo de áreas.

- Reportes y registros de dosimetría personal.
- Implementación de programas de control de calidad en radiología veterinaria.
- Impacto del correcto posicionamiento del animal durante la adquisición de la imagen.
- Principales proyecciones y posiciones en radiología veterinaria.
- Elementos necesarios de protección para el personal ocupacionalmente expuesto, el paciente y el público.
- Blindaje de las radiaciones ionizantes.
- Monitoreo ocupacional del personal expuesto.

Tema # 8: Aspectos legales, normativas y regulaciones nacionales e internacionales en materia de protección radiológica.

- Normas internacionales en materia de protección radiológica.
- Leyes y normativas nacionales en materia de protección radiológica.

Referencias.

Camacho, A. (2017). *Propuesta para el fortalecimiento del servicio de radiología del Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Universidad Nacional de Costa Rica, a partir del diagnóstico de los procedimientos empleados para los diferentes estudios, durante el período* . Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Decreto Ejecutivo 24037- S, Reglamento Sobre Protección Contr las Radiaciones Ionizantes. (1994).

http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?par

am1=NRTC&nValor1=1&nValor2=15464&nValor3=76357&strTipM=TC

Giaccia, E., Hall, J., & Amato, J. (2012). *Radiobiology for the radiologist* (7th ed.). Lippincott Williams & Williams.

Hernández-Ruiz, L., Jimenez-Flores, Y., Rivera-Montalvo, T., Arias-Cisneros, L., Méndez-Aguilar, R. E., & Uribe-Izquierdo, P. (2012). Thermoluminescent dosimetry in veterinary diagnostic radiology. *Applied Radiation and Isotopes*, 71, 44–47.

<https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.06.023>

Huda, W. (2016). *Review of radiologic physics* (4th ed.). Wolters Kluwer.

International Atomic Energy Agency. (2010). *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students* (International Atomic Energy Agency (Ed.)).

International Atomic Energy Agency. (2018). *Occupational Radiation Protection*. International Atomic Energy Agency. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/PUB1785_web.pdf

Nájera, A., & Arribas, E. (2015). *Fundamentos de física para profesionales de la salud*. Elsevier.

Organismo Internacional de Energía Atómica. (2014). *Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas*. Organismo Internacional de Energía Atómica.

Organismo Internacional de Energía Atómica. (2016). Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas internacionales de seguridad. In *Organismo Internacional de Energía Atómica*. Organismo Internacional de Energía Atómica.

10.5. Versiones preliminares de los modelos de regresión lineal múltiple

10.5.1. Muestra total

Resumen del modelo

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	valor de p
0,634	0,401	0,271	0,305108	0,014

Variables seleccionadas

Variables	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	valor de p	Intervalo de confianza (95%)		VIF
	B	Error estándar				Límite inferior	Límite superior	
Constante	0,505	0.345	-	1.465	0.153	-0,197	1,207	-
Edad	0,015	0.006	0.499	2.691	0.011	0,004	0,027	1.883
Sexo	-0.428	0.116	-0.646	-3.697	0.001	-0,663	-0,192	1.674
Radio-grafías/día	0.022	0.013	0.455	1.764	0.087	-0,003	0,048	3.644
Sustancias químicas	0.138	0.104	0.207	1.338	0.190	-0,072	0,349	1.311
Alcohol	0.021	0.096	0.037	0.223	0.825	-0,174	0,216	1.490
Exposición (años) a RI	0.006	0.013	0.101	0.463	0.647	-0,021	0,033	2.601
Grupo	0.110	0.181	0.152	0.555	0.582	-0,268	0,468	4.086

10.5.2. Grupo expuesto

Resumen del modelo

R	R cua- drado	R cua- drado ajustado	Error estándar de la estimación	valor de p
0.74	0.548	0.386	0.213265	0.032

Variables seleccionadas

Variables	Coeficientes no estandarizados		Coeficien- tes estandarizados	t	valor de p	Intervalo de confianza (95%)		VIF
	B	Error estándar				Límite inferior	Límite superior	
Constante	0.595	0.266	-	2.235	0.042	0,024	1,166	-
Edad	0.02	0.01	0.781	2.03	0.062	-0,001	0,042	4.582
Sexo	-0.367	0.131	-0.692	-2.798	0.014	-0,649	-0,086	1.895
Radiografía/día	0.02	0.01	0.436	1.952	0.071	-0,002	0,043	1.542
Exposición (años) a RI	-0.003	0.017	-0.065	-0.159	0.876	-0,040	0,034	5.138
Sustancias químicas	0.048	0.108	0.09	0.444	0.664	-0,184	0,280	1.286

10.5.3. Grupo no expuesto

Resumen del modelo

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	valor de p
0.580	0.337	0.160	0.348295	0.162

Variables seleccionadas

Variables	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	valor de p	Intervalo de confianza (95%)		VIF
	B	Error estándar				Límite inferior	Límite superior	
Constante	0.632	0.330	-	1.915	0.075	-0,072	1,337	-
Edad	0.014	0.008	0.433	1.733	0.104	-0,003	0,031	1.408
Sexo	-0.505	0.202	-0.682	-2.497	0.025	-0,937	-0,074	1.688
Alcohol	0.074	0.131	0.130	0.563	0.582	-0,205	0,353	1.209
Sustancias químicas	0.249	0.194	0.320	1.281	0.220	-0,165	0,662	1.413